

**Université de Montréal**

**Culture des ostéoblastes dans un gel de Pluronic F-127 : Effet  
sur la viabilité et le phénotype cellulaire**

par

**Clemente Augusto Lacerda**

Laboratoire de recherche en orthopédie  
Hôpital du Sacré-cœur de Montréal

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en Sciences Biomédicales

Décembre 2004

© Clemente Augusto Lacerda, 2004



W

4

U58

2005

v. 161

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :  
**Culture des ostéoblastes dans un gel de Pluronic F-127 : Effet  
sur la viabilité et le phénotype cellulaire**

Présenté par  
**Clemente Augusto Lacerda**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Daniel Lajeunesse, Ph.D.  
Président-rapporteur

Julio Fernandes, MD, M.Sc.  
Directeur de recherche

Mohamed Benderdour, Ph.D.  
Codirecteur

Florina Moldovan, MD, Ph.D.  
Membre du jury

## Résumé

L'objectif de cette étude est d'étudier la viabilité cellulaire et l'expression phénotypique des ostéoblastes *in vitro* dans le gel Pluronic® F-127 (BASF), un copolymère poly (éthylène oxyde- $\beta$ -propylène oxyde- $\beta$ -éthylène oxyde) (PEO-PPO-PEO) qui reste liquide en dessous de la température 15°C et qui se solidifie à plus de 25°C. Ce gel est un polymère biodégradable et thermo sensible et aussi thermo réversible. Le Pluronic® F-127 a été en grande partie étudié dans la formation du cartilage, parmi beaucoup d'autres applications médicales. Une seule étude scientifique au sujet de l'utilisation du gel Pluronic® F-127 avec des ostéoblastes a été publiée jusqu'à présent. Dans cette étude, les ostéoblastes MG-63 ont été cultivés pendant une période de 0, 2, 4 et 6 jours dans une matrice tridimensionnelle composés d'une solution de 17% du gel Pluronic® F127 préparé dans le *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM). Le total de cellules vivantes a été de 83% au deuxième jour, 73% au quatrième jour et de 63% au sixième et dernier jour. Cette mortalité cellulaire est probablement due à l'insuffisance des éléments nutritifs et d'oxygène. L'expression typique du phénotype ostéoblastique des cellules MG-63 dans le gel Pluronic® F-127, mesurée par l'activité de la phosphatase alcaline et de la production du collagène de type I varie tout au long de la période d'incubation. Nos résultats montrent que l'expression protéique de la cyclo-oxygenase-2 (COX-2) suit la même tendance que la production de la prostaglandine E2 (PGE<sub>2</sub>). Cette expression est plus importante au quatrième jour et diminue au sixième jour. Une fois perfectionnée, cette technologie aurait des applications *in vivo* et *in vitro* comme véhicule pour la thérapie cellulaire appliquée aux lésions osseuses.

Mots-clés : poloxamer; Pluronic® F-127 (BASF); ostéoblastes; injectable; thermo sensible; gel.

## Abstract

The overall objective of this study was to investigate the cellular viability and phenotype expression of osteoblast cells *in vitro* in Pluronic® F-127 (BASF), a triblock copolymer block of poly (ethylene oxide- $\beta$ -propylene oxide- $\beta$ -ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) that is liquid below 15°C and solid when thawed above 25°C. This gel is a biodegradable, thermo-sensitive polymer, with “reverse thermal gelation” properties. Pluronic® F-127 has been largely studied in cartilage tissue formation, among many other medical applications. Only one scientific study about the use Poloxamer F-127 gel with osteoblasts was published until now. In this study, MG-63 cells were cultured in a scaffold for a period of 0, 2, 4 and 6 days with 17% of Pluronic® F-127 solution in Dulbecco’s modified eagle medium (DMEM). Our results show that incubation of osteoblasts in Pluronic gel was associated with a progressive increase of cellular mortality and reached 37% at 6 day of incubation. The cell viability was 83% at the second day, 73% at the fourth day and of 63% at the sixth and last day. The increasing cellular mortality is probably due to either nutrient or oxygen deficiencies. The typical expression of the osteoblastic phenotype of MG-63 cells in the Pluronic® F-127 gel is not modified, as shown by the activity of alkaline phosphatase and by the production of type I collagen. Our results show that the protein expression of the cyclo-oxygenase-2 (COX-2) follows the same tendency as the production of prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>). This expression is more important at the fourth day and decreases at the sixth day. Once perfected, this technology will have both *in vivo* and *in vitro* applications for a vehicle for cell therapy in bone lesions.

**Keywords:** poloxamer; pluronic® F-127 (BASF); osteoblasts; thermo sensible; injectable biomaterials; gel.

## Table des matières

TITRE .....	ii
IDENTIFICATION DU JURY .....	iii
RÉSUMÉ .....	iv
ABSTRACT .....	v
TABLE DES MATIÈRES .....	vi
LISTE DES FIGURES .....	ix
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	x
DÉDICACE .....	xii
REMERCIEMENTS .....	xiii
<b>CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE .....</b>	<b>1</b>
1.1 Les matrices polymériques en génie tissulaire .....	1
1.2 Polymères appliqués aux cellules ostéoblastiques.....	5
1.3 Le polymère Pluronic® F-127 .....	7
1.4 Applications du gel Pluronic® F-127 .....	16
1.5 L'objectif de cette étude .....	19

**CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES .....20**

2.1 Préparation du gel .....	20
2.2 Culture cellulaire .....	21
2.3 Décompte et viabilité cellulaire .....	22
2.4 Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline (ALPase) .....	23
2.5 Dosage de la prostaglandine E2 (PGE <sub>2</sub> ) par EIA .....	23
2.6 L'expression du collagène de type I et II et de la COX-2 .....	24
2.6.1 L'expression des ARNm.....	24
2.6.2 L'expression protéique .....	26
2.7 Analyses statistiques.....	28

**CHAPITRE 3 RÉSULTATS .....29**

3.1 La viabilité cellulaire .....	29
3.2 Le phénotype cellulaire .....	31
3.2.1 L'activité de la phosphatase alcaline .....	31
3.2.2 L'expression du collagène de type I .....	33
3.2.2.1 L'expression protéique .....	33
3.2.2.2 L'expression des ARNm.....	35
3.3 Dosage de la PGE <sub>2</sub> .....	37



3.4	L'expression de la COX-2.....	38
3.4.1	L'expression protéique .....	38
3.4.2	L'expression des ARNm.....	40

## **CHAPITRE 4 DISCUSSION .....42**

4.1	Viabilité cellulaire .....	42
4.2	Phénotype cellulaire.....	49
4.2.1	Phosphatase alcaline .....	49
4.2.2	Collagène de type I .....	52
4.3	COX-2.....	54
4.4	PGE <sub>2</sub> .....	57
4.5	Applications cliniques potentielles de l'étude .....	59

## **CHAPITRE 5 CONCLUSION.....63**

## **RÉFÉRENCES .....64**

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE

Figure 1.1	La structure chimique du gel Pluronic® F-127 .....	7
Figure 1.2	Le grade du gel Pluronic® F-127 .....	10
Figure 1.3	Les propriétés toxiques du gel Pluronic® F-127 .....	11

### CHAPITRE 3 RÉSULTATS

Figure 3.1	La viabilité cellulaire des ostéoblastes MG-63 mesurée par le test MTT .....	30
Figure 3.2	Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline .....	32
Figure 3.3	L'expression protéique du collagène de type I et de type II mesurée par immunobuvardage .....	34
Figure 3.4	L'expression des ARNm du collagène de type I et type II mesurée par RT-PCR .....	36
Figure 3.5	Mesure de la production de la PGE <sub>2</sub> par EIA .....	37
Figure 3.6	L'expression protéique de la COX-2 par immunobuvardage ....	39
Figure 3.7	L'expression des ARNm de la COX-2 par RT-PCR.....	41

## Liste des sigles et abréviations

(en ordre alphabétique)

ADN: acide désoxyribonucléique

ALP: *alkaline phosphatase*

ARNm: acide ribonucléique mesager

COX-2: *cyclooxygenase-2*

DMEM: *Dulbecco's modified eagle medium*

EDTA: *ethylenediaminetetraacetic acid*

EIA: *enzyme immunoassay*

FBS: *fetal bovine serum*

FDA: *Food and Drug Administration*

FGF: *fibroblast growth factors*

GAPDH: *glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase*

MEM: *minimum essential medium*

PASP: poly(acide aspartique)

PBS: *phosphate buffered saline*

PCL: poly( $\epsilon$ -caprolactone)

PDLLA: poly(D,L-lactic acide)

PEG: polyethylene glycol

PEGDA: poly-éthylène glycol – dyacrylate

PEO-PPO-PEO: *poly(ethylene oxide) – poly(propylene oxide) – poly(ethylene oxide)*

PGA: *polyglycolic acid*

PGE<sub>2</sub>: prostaglandine E2

PLA: *polylactic acid*

PLG: *polylactide coglycolide*

PLGA: *polylactide coglycolic acid*

PLLA: *poly(l-lactic acid)*

PPF: *polypropylene fumarate*

RT-PCR : *reverse transcriptase polymerase chain reaction*

TGP: polymère de gélification thermoreversible

TTBS: *Tris-buffered saline Tween*

UHMWPE: *high molecular weight polyethylene*

## **Dédicace**

À ma tendre moitié et épouse Adriana, que je remercie fortement pour son amour et dévouement et d'être toujours à mes côtés. Pour tout son amour et affection à moi.

À ma petite récemment arrivée et bien-aimée Rafaella.

À mes parents pour tout les efforts qu'ils ont fait pour mon éducation.

## **Remerciements**

J'exprime mes remerciements à mon directeur le Dr Julio Fernandes, pour m'avoir accepté dans son laboratoire de recherche.

Je remercie tous mes collègues de laboratoire, principalement à Mohamed et Shi, puisque sans eux ce travail serait non-viable.

Je remercie encore une fois ma femme d'avoir supporté mon indisponibilité et stress tout au long de cette recherche.

Je remercie vivement tous mes amis et tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE

### 1.1 LES MATRICES POLYMÉRIQUES EN GÉNIE TISSULAIRE

Un gel est défini comme un réseau tridimensionnel gonflé par un solvant. Habituellement, le solvant est le composant principal d'un gel. Les gels peuvent être classifiés en deux catégories basées sur la façon de la stabilisation du réseau : les gels chimiques constitués par les liens covalents et les gels physiques constitués par les forces secondaires (Arévalo *et al*, 2000). Certains gels sont réversibles par la température, et ceux-ci s'appellent les gels thermoréversibles : liquides à une température  $\leq 15^{\circ}\text{C}$  et solides à une température  $\geq 25^{\circ}\text{C}$ . Une propriété physique unique est la nature réversible de ces gels. Lors d'une diminution de la température, le gel retourne à sa forme liquide. Lors du réchauffement, il redevient solide. Le gel peut être refroidi ou réchauffé à plusieurs reprises sans aucun changement des ses propriétés (Brown *et al.*, 1991 ; Schmolka *et al.*, 1972).

Les matrices tridimensionnelles de polymère doivent posséder plusieurs caractéristiques principales, y compris la porosité élevée de la superficie du gel, la résistance structurale du gel et les formes tridimensionnelles spécifiques, pour qu'elles puissent être utiles comme des matériaux pour la technologie de tissu. Ces caractéristiques sont déterminées par la technique de fabrication de la

matrice tridimensionnelle, qui doit être développée sans compromettre la biocompatibilité du matériel pendant sa construction. Des nouvelles techniques ont été développées pour fabriquer la matrice tridimensionnelle avec des caractéristiques souhaitables et reproductibles, qui ont été employées pour démontrer la praticabilité de régénérer le tissu humain. Ces techniques de fabrication de la matrice tridimensionnelle du gel de polymère ont été travaillées pour créer des matrices tridimensionnelles avec des caractéristiques particulières qui répondront aux exigences critiques de génie tissulaire des organes spécifiques, principalement dans le tissu osseux.

La restauration de la fonction d'un organe en utilisant le génie tissulaire exige souvent l'utilisation d'une matrice tridimensionnelle solide provisoire. La fonction de cette matrice est de diriger la croissance des cellules émigrantes du tissu environnant (conduction du tissu) ou la croissance des cellules semées dans la structure poreuse de la matrice tridimensionnelle solide. La matrice tridimensionnelle solide doit fournir un substrat approprié pour l'attachement, pour la prolifération et pour la fonction différenciée de cellules, et, dans certains cas, pour la migration de cellules. Ces besoins critiques peuvent être répondus par le choix d'un matériel approprié pour construire la matrice tridimensionnelle solide (Gutowska *et al*, 2001).

La grande majorité des matériaux biocompatibles seraient potentiellement employée pour construire des matrices tridimensionnelles



solides. Cependant, un matériel biodégradable est normalement désiré parce que le rôle de cette matrice est, habituellement, seulement provisoire.

La condition principale de n'importe quelle technique de traitement d'un polymère est non seulement l'utilisation des matériaux biocompatibles, mais que le processus ne devrait nullement affecter la biocompatibilité du polymère. La technique de traitement devrait également permettre la fabrication des matrices tridimensionnelles solides avec le contrôle de la porosité et de la taille des pores, les deux facteurs importants dans la régénération des tissus.

Une matrice tridimensionnelle solide fortement poreuse est souhaitable pour permettre l'ensemencement ou la migration des cellules dans tout le matériau. La taille des pores joue un rôle critique dans la croissance du tissu en direction interne et la superficie interne disponible pour l'attachement des cellules. Une grande superficie est exigée, de sorte qu'un nombre élevé de cellules, suffisamment pour remplacer la fonction d'organe de restauration, puisse être cultivé (Vacanti *et al*, 1991).

Les propriétés mécaniques de la matrice tridimensionnelle solide sont souvent importants, particulièrement en régénérant les tissus durs tels que le cartilage et l'os. Bien que les propriétés du polymère, telle que la porosité, aient un effet profond sur ses propriétés mécaniques, le traitement de ce polymère serait essentiel à cet égard. La résistance à la traction peut, par exemple, être augmentée due à la cristallisation des chaînes de polymère (Cima *et al*, 1991).

Alternativement, le processus de fabrication peut causer une réduction du poids moléculaire du polymère, ayant pour résultat un effet qui pourrait être nocif sur les propriétés mécaniques (Cao *et al*, 1999). La forme d'un tissu dur est souvent importante pour sa fonction et dans ce cas-ci la technique de traitement doit permettre la préparation de matrices tridimensionnelles avec des géométries tridimensionnelles irrégulières.

Dans le cas des matrices tridimensionnelles solides, les paramètres importants pour la conception des dispositifs sont : la microstructure extérieure de chimie et de surface, la porosité et les dimensions macroscopiques (3D), la forme et le choix de l'emplacement d'implantation. Ces paramètres influencent la capacité des cellules de s'attacher, de se développer, de fonctionner, et affectent le transport des aliments à la cellule implantée (Vacanti *et al*, 1991).

Le génie tissulaire avec des systèmes d'hydrogels injectables *in situ* peut offrir plusieurs avantages par rapport à une matrice tridimensionnelle solide: le matériel fluide peut remplir n'importe quelle forme d'un défaut, il peut incorporer divers agents thérapeutiques (par exemple, des facteurs de croissance) par un mélange simple, il ne contient pas les solvants résiduels qui peuvent être présents dans une matrice tridimensionnelle solide et, finalement il n'exige pas le procédé chirurgical pour son placement (Alexandridis, 1997; Gutowska *et al*, 2001).

## 1.2 POLYMÈRES APPLIQUÉS AUX CELLULES OSTÉOBLASTIQUES

Plusieurs polymères biodégradables normaux et synthétiques, tels que le collagène, le poly( $\alpha$ -hydroxyesters), et le poly(anhydrides), ont été largement, et avec succès, utilisés comme matériaux d'une matrice tridimensionnelle solide dus à leur versatilité et aussi pour leur facilité de traitement (Thomson *et al*, 1995).

Des études ont employé le poly( $\alpha$ -hydroxyesters) en tant que produit de départ pour fabriquer des matrices tridimensionnelles solides en utilisant une grande variété de techniques. Ces polymères ont été couronnés de succès en tant que substrats provisoires pour un certain nombre de types de cellules, permettant l'attachement, la prolifération et la différentiation des cellules (Gutowska *et al*, 2001; Jeong *et al*, 1999 et 2000a,b).

Les gels ( $\alpha$ -hydroxyesters), tels que l'acide poly(l-lactique) (PLLA), les copolymères poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA), et l'acide poly(glycolique) (PGA), sont des polymères linéaires et non réticulés. Ces matériaux sont biocompatibles, dégradables par l'hydrolyse simple, et sont approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour certaines applications cliniques, tels que le génie tissulaire, la matrice tridimensionnelle, des systèmes de livraison de médicaments, les sutures biodégradables et des industries biotechnologiques et pharmaceutiques, (Gutowska *et al*, 2001; Jeong *et al*, 1997, 1999 et 2000a,b).

Lee *et al* (2002) ont étudié l'adhésion et la prolifération des ostéoblastes dans une matrice tridimensionnelle en poly(L-lactide) PLLA-chitosan. Les résultats ont démontré que le chitosan revêtu par le PLLA induit une augmentation de la prolifération et de l'adhésion des ostéoblastes à cette matrice tridimensionnelle comparativement à une surface de PLLA pure. Comme conclusion, cette étude a suggéré que la matrice en poly(L-lactide) PLLA-chitosan pourrait être utilisée comme base pour que des ostéoblastes puissent induire une régénération du tissu osseux.

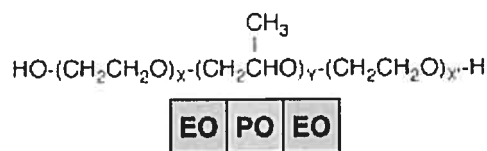
Selon une étude de Payne *et al* (2002) l'encapsulation temporaire des ostéoblastes dans un polymère en poly(fumarate propylène) (PPF), pendant 7 jours, augmente la viabilité et la prolifération cellulaire (35%) comparativement à des cellules de même type et non encapsulées.

Verderio *et al* (2000) ont comparé la culture des ostéoblastes dans différents polymères : le poly(DL-lactide co-glycolide) (PLG), le poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) et le poly(L-lactide) (PLA). Ceux-ci sont des biomatériaux bien utilisés dans les implants médicaux. Les résultats démontrent que 85% des cellules se propagent et se fixent dans la matrice composée de PLG. Cependant, en utilisant la matrice composée de PCL et PLA, une grande partie des cellules n'adhèrent pas à la matrice. Les auteurs ont observé une faible absorption des protéines et des facteurs de croissance. Par rapport au PLA et au PCL, l'attachement des ostéoblastes au PLG est favorisé par une combinaison de

l'augmentation de la hydrophilie, de sa structure amorphe et du glycolide contenu dans ce polymère.

### 1.3 LE POLYMÈRE PLURONIC® F-127

Récemment, les polymères thermosensibles ont mérité une attention particulière de la part des chercheurs. Le gel Pluronic® F-127 (Pluronic® F-127, BASF, Mount Olive, NJ) (Figure 1.1), est bien connu dans la communauté de la science des polymères, mais des recherches sur son utilisation potentielle comme une matrice tridimensionnelle est encore à ses débuts.



**Figure 1.1. La structure chimique du gel Pluronic® F-127**

Les copolymères disponibles en poly (éthylène oxyde-β-propylene oxyde-β-éthylène oxide) (PEO-PPO-PEO) copolymères - Pluronic® F-127 également connu sous le nom de Poloxamers (BASF, Mount Olive, NJ) sont

des exemples de polymères thermoréversibles (Malmsten *et al*, 1992 ; Gutowska *et al*, 2001).

C'est une famille de plus de 50 différents bloc polymères non ioniques d'oxyde hydrophobique de propylène (PO) et d'oxyde hydrophilique d'éthylène (EO), couvrant une gamme de liquides, de pâtes et de solides. Les Poloxamers se composent de 70% d'une molécule centrale de polyoxypropylène (POP), qui est flanquée des deux côtés pour deux chaînes de 30% de polyoxyéthylène (POE) (Moghimi *et al*, 2000).

Le Poloxamer est un polymère biocompatible qui possède des caractéristiques thermiques réversibles de gélification; c'est-à-dire, le matériau existe comme un gel liquide à basse température et comme un gel solide à la température du corps (37°C). Cette propriété est connue en tant que "gélification thermique réversible" et c'est une conséquence de la configuration micellaire du polymère dans la solution. À basse température, le gel retourne à un état liquide. Lors de son réchauffement, le gel se reforme. Ce changement d'état physique peut se reproduire indéfiniment, parce que la gélification est dépendante de la température.

Le polymère Pluronic® F-127 a été choisi pour cette étude, parmi tous les poloxamer, pour ses caractéristiques car il est un des polymères avec le minimum de toxicité et aussi parce qu'il forme un gel à des faibles concentrations. À partir de seulement 17% à 25°C, la gélification survient,

tandis que les autres polymères de cette famille exigent une concentration plus élevée en polyoxyethylene (Arévalo-Silva *et al*, 2000). Le gel devient plus dur si la concentration de Pluronic® F-127 augmente jusqu'à 90% (Arévalo *et al*, 2000).

Schmolka *et al* (1972) ont étudié la toxicité du gel de Pluronic® F-127. Dans la figure 1.2 on peut observer que ce gel, qui fait partie de la famille Poloxamer, est le moins toxique entre eux, parce que plus son poids moléculaire augmente, moins le gel est toxique. On peut voir dans ce tableau que le Pluronic® F-127 à poids moléculaire de 4 kDa est le plus élevé de la famille Poloxamer (Figures 1.2. et 1.3).

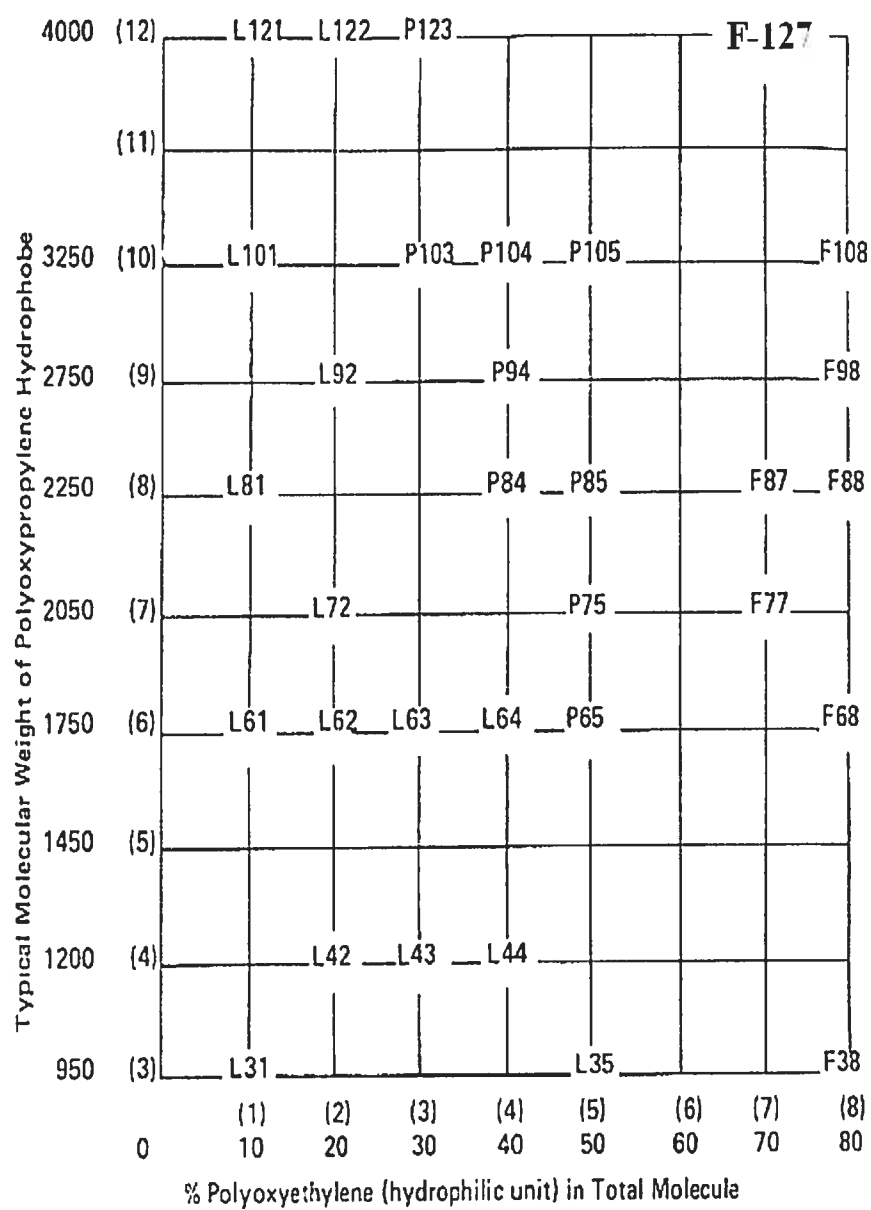
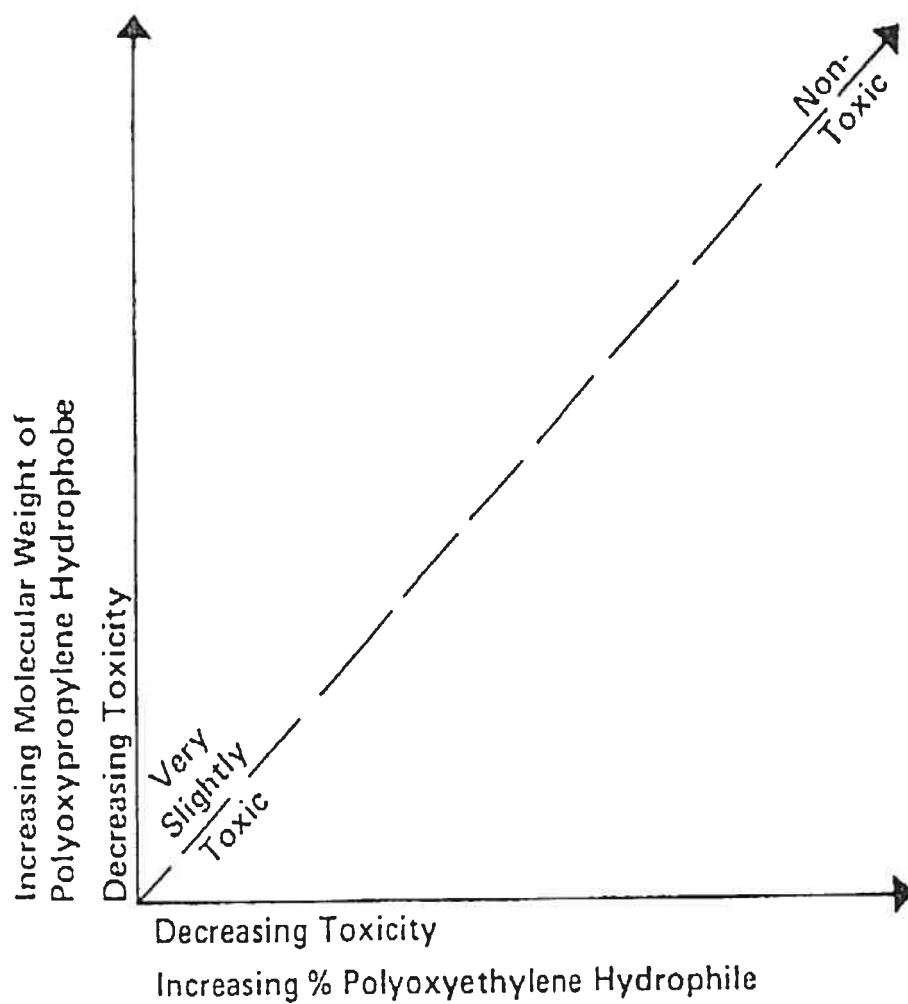


Figure 1.2 Le grade du gel Pluronic® F-127 selon Schmolka *et al*, 1972





**Figure 1.3 Les propriétés toxiques du gel Pluronic® F-127**

Dans ce graphique, Schmolka *et al*, 1972 confirment que la toxicité du gel Poloxamer F-127 est la plus basse de toute la famille Poloxamer.

Le Pluronic® F-127 est un gel non toxique, biocompatible, bio absorbable et a été employé chez l'humain en tant que pansement biologique (Henry *et al*, 1989; Tomida *et al*, 1987). En outre, il a une capacité de solubilisation élevée, par conséquent, des gels de Pluronic® F-127 ont été largement étudiés comme système de livraison de médicaments (Chen-Chow *et al*, 1981; Collet *et al*, 1985; Gilbert *et al*, 1986; Miller *et al*, 1982; Miyazaki *et al*, 1984).

Les propriétés toxicologiques dans cette série de polymères ont été étudiées pendant 20 ans (Schmolka *et al*, 1972). Le Pluronic® F-127, qui a un poids moléculaire nominal de 12.5 kDa et un rapport de PEO/PPO de 2:1 en poids, a été le plus largement répandu de ces copolymères dans les systèmes pharmaceutiques (Pandit *et al*, 1996). On a longtemps su que les solutions de Pluronic® F-127 au-dessus d'une concentration d'environ 20% (w/w) sont liquides une fois frigorifiées, et qu'elles gélifient lors du réchauffement (Schmolka *et al*, 1972).

Le processus de formation du gel a été intensivement étudié au cours de plusieurs années (Brown *et al*, 1991; Linse *et al*, 1997; Rassing *et al*, 1983; Wanka *et al*, 1990). Ces études prouvent que la formation du gel se produit en raison de la déshydratation progressive des micelles de polymère à mesure que la température augmente, menant à l'enchevêtrement accru de chaînes. Les propriétés physico-chimiques des gels F127 ont été étudiées (Brown *et al*, 1991; Gilbert *et al*, 1987; Pec *et al*, 1992; Wanka *et al*, 1990) et l'influence des

additifs sur la température de formation du gel et de la viscosité du gel de quelques systèmes a été rapportée (Gilbert *et al*, 1987 ; Malmsten *et al*, 1992 ; Schmolka, 1972). Gilbert *et al* ont analysé le comportement du gel Pluronic® F-127 dans une concentration de 26-34% avec l'addition de 0.5 mM du additif pyrene et dissous dans le diméthylformamide. Les résultats démontrent que la microviscosité de la solution a diminuée, et il y avait une augmentation dans la température requise pour former le gel (Gilbert *et al*, 1987).

Malmsten *et al*, ont évalué la viscosité et la température du gel Pluronic® F-127 en analysant la diffusion du gel dans une région déterminée avec la présence d'additifs tels que le NaCl et NaSCN. Avec le premier sel, le gel se répandre par toute la région, et diminue sa température de gélification. Avec le deuxième sel, le gel se disperse moins et augmente sa température de gélification. Selon les auteurs, la dispersion du gel dépend fortement de la présence des additifs dans sa composition (Malmsten *et al*, 1992). Ceci est très important, puisque les sels inorganiques sont généralement employés pour contrôler le pH et quelques autres additifs peuvent être exigés pour stabiliser la formulation du gel. À une concentration plus élevée du gel Pluronic® F-127, la distance entre les micelles et le degré de gonflement seront réduits. Ceci diminue la température de gélification et, par conséquence, change la viscosité et les caractéristiques d'uniformité de la formulation du gel. La température à laquelle les gels liquides gélifient dépend de la concentration du gel et du type et de la quantité des additifs. Ainsi, l'addition d'un agent, tel que la glycérine,

augmentera la force du gel, davantage que l'addition de la même quantité du propylène glycol (Schmolka, 1972).

Schmolka a conclu que des additifs affectent la résistance du gel Pluronic® F-127, mais de façons différentes. Par exemple, les acides peuvent diminuer la résistance du gel due à la formation des ions oxonium. L'utilisation d'isopropyl alcool comme additifs tend à baisser la résistance du gel. L'inclusion des surfactants anioniques ou cationiques diminue aussi la résistance du gel, dû à la formation des micelles mélangées. Par contre, l'utilisation de certains produits chimiques organiques insolubles augmente la résistance du gel.

Un groupe de chercheurs au centre médical de l'Université de Massachusetts, a produit un cartilage porcin en semant des chondrocytes sur une matrice tridimensionnelle de Pluronic® F-127 (Cao *et al*, 1998). Dans cette étude, les auteurs ont comparé trois polymères pour produire du cartilage artificiel, en utilisant des chondrocytes autologues auriculaires dans un modèle animal porcin immunocompétent. Les chondrocytes isolés ont été maintenus dans une matrice tridimensionnelle et implantés en sous-cutanée de l'animal. Tous les échantillons ont démontré la formation de cartilage à un degré variable après 6 semaines d'implantation. En utilisant le Pluronic® F-127 comme matrice tridimensionnelle, les aspects histologiques ressemblent à ceux du cartilage hyalin natif. Il y a un arrangement plus organisé des cellules et la présence d'élastine dans le cartilage produit. Le comportement des

constructions de cellule-polymère n'est pas entièrement bien connu et des résultats semblent être liés à plusieurs facteurs, y compris la réaction inflammatoire.

Un autre groupe au même établissement (Arévalo *et al*, 2000) a rapporté une étude sur la culture de chondrocytes porcins dans le gel Pluronic® F-127. Cette étude a évalué l'hypothèse qu'un cartilage autologue produit peut être bioincorporé avec une matrice tridimensionnelle. Ils ont utilisé trois groupes de étude : groupe 1 (contrôle) en utilisant 5 différents polymères (polyéthylène ; acrylique ; polyméthylmethacrylate ; Silastique extra purifié ; Silastic conventionnel) ; groupe 2, les cinq polymères couverts par le gel Pluronic® F-127, et le groupe 3 les implantes couverts par le gel Pluronic® F-127 et répandu par des chondrocytes. Les résultats ont montré que dans le groupe 3 du cartilage a été produit et que dans le groupe 2, la couverture du gel Pluronic® F-127 a été presque que rempli par un cartilage élastique avec un minimal de fibrocartilage.

#### 1.4 APPLICATIONS DU GEL PLURONIC F-127

L'utilisation des copolymères de bloc de Pluronic® F-127 dans la médecine expérimentale et les sciences pharmaceutiques a une longue histoire. Henry *et al* (1989) ont rapporté les résultats des expériences préliminaires dans lesquelles le Poloxamer 407 a empêché la formation d'adhérences péritonéales après un trauma pelvien chez les rats.

Steinleitner *et al* (1991) ont étudié le Poloxamer 407 comme un matériau intra péritonéal de barrière pour la prévention de la formation d'adhérences post chirurgicales. Les buts de cette étude étaient de confirmer les propriétés d'anti adhésion du Poloxamer 407 dans un système différent et d'exécuter des études de dose-réponse pour évaluer la formulation optimale du Poloxamer 407 pour la prévention de l'adhérence. Le succès du Poloxamer 407 en empêchant l'apparition des adhérences secondaires dans le modèle utilisé dans cette expérience suggère que cet agent puisse avoir un potentiel significatif pour réduire l'apparition d'adhérence dans des situations cliniques analogues.

Le Poloxamer 407 a plusieurs caractéristiques physiques qui peuvent le rendre supérieur à d'autres gels, comme un matériau de barrière pour utilisation dans les chirurgies gynécologiques et abdominales. Les propriétés thermosensibles du gel Poloxamer 407, sont idéales pour l'application de tissu pendant une chirurgie laparoscopique (Steinleitner *et al*, 1991).

Des copolymères en Poly (éthylène oxyde) - poly (propylène oxyde) - poly (éthylène oxyde) (PEO-PPO-PEO) sont largement répandus dans des applications industrielles diverses (Alexandridis *et al*, 1997). Récemment, les copolymères de PEO-PPO-PEO ont attiré un intérêt considérable de la part des industries biotechnologiques et pharmaceutiques pour leurs capacités uniques d'agent tensioactifs, à basse toxicité, et à réaction immunitaire minimale (Nace *et al*, 1996; Tan *et al*, 1993).

Ces gels ont suscité l'attention croissante au cours des années en tant que systèmes de livraison de médicaments pour application topique, transdermique, ophtalmique et implantable (Chi *et al*, 1990; Miller *et al*, 1982; Miyazaki *et al*, 1995; Pec *et al*, 1992; Such *et al*, 1996).

Le Pluronic® F-127 a été également étudié comme un véhicule pour l'administration intramusculaire et sous-cutanée de médicaments (Gusman *et al*, 1992). Les gels de Poloxamer possèdent également les caractéristiques principales d'un matériau optimal pour la gestion précoce des brûlures de la peau (Schmolka *et al*, 1972). Le Poloxamer 407 avec des agents bactériostatiques bactéricides enfermés ont été employés en tant que peau artificielle dans le traitement de brûlures au troisième degré (Nalbandian *et al*, 1987).

En raison de sa nature d'agent tensioactif, le Poloxamer nettoie également la blessure des débris du tissu. Nalbandian *et al* (1987), ont suggéré

que le Poloxamer 407 augmente le taux de guérison de la blessure de manière significative, probablement par la stimulation de la production endogène de facteur épidermique de croissance. Le gel de Pluronic® F-127 a été employé médicalement pour la première fois comme un véhicule pour les sels argentés pour traiter les brûlures topiques.

Des gels topiques de deux drogues anti-inflammatoires, diclofenac et hydrocortisone, ont été préparés avec le Pluronic® F-127 (Tomida *et al*, 1987). Une autre étude a indiqué qu'une formulation de suppositoire de Poloxamer F-127 d'indométacine était la plus appropriée entre plusieurs autres gels pluronics examinés chez les lapins dus à son action prolongée et ses effets secondaires minimaux (Miyazaki *et al*, 1987). Un gel dentaire de Pluronic® F-127 (Protect - Butler Brush), a été en service plusieurs années pour traiter des patients avec la gencive et les dents sensibles (Zinner *et al*, 1997).

Saim *et al* (2002) ont injecté des chondrocytes auriculaires suspendus dans un hydrogel de Pluronic® F-127 dans le dos de souris. Comme conséquence la formation d'un cartilage dont la taille et la forme approximative d'une spirale humaine d'oreille a été observée. L'hydrogel a servi de matrice tridimensionnelle structurelle provisoire. Observé au microscope, le cartilage produit était très semblable au cartilage original. Cette étude a démontré qu'une matrice tridimensionnelle du gel Pluronic® F-127 permet d'utiliser les chondrocytes dans le génie tissulaire afin de former un cartilage hyalin de qualité.



Les gels de Pluronic® F-127 ont été utilisés pour la livraison topique de la lidocaine et de la benzocaine (Chen-Chow *et al*, 1981), comme véhicules pour les drogues anticancéreuses 5-fluorouracil et l'adriamycin (Miyazaki *et al*, 1995), et pour la guérison de brûlures (Nalbandian *et al*, 1987; Schmolka *et al*, 1972).

Le traitement actuel des défauts osseux est basé sur la chirurgie dans le site pour faire la réparation de l'os, ce qui est plus invasif et traumatisant. Le présent projet de recherche vise une nouvelle approche en utilisant un biomatériau pour la réparation de l'os, qui soit le moins invasif possible.

## **1.5 L'OBJECTIF DE CETTE ÉTUDE**

Le but de cette étude était d'évaluer la viabilité et le phénotype des ostéoblastes incubés dans une matrice tridimensionnelle composée du gel Pluronic® F-127. Nous avons voulu vérifier que le maintien de ces cellules dans cette matrice n'affecte pas en particulier leur viabilité et leur phénotype cellulaire. La caractérisation de leur phénotype cellulaire a été réalisée à l'aide du dosage de l'activité de la phosphatase alcaline et de l'expression du collagène de type I. En parallèle, nous avons vérifié la réponse inflammatoire des cellules MG-63 via le système COX-2/ PGE<sub>2</sub>.

## CHAPITRE 2 Matériels et Méthodes

### 2.1 PRÉPARATION DU GEL

Le polymère utilisé dans notre projet est un polymère commercial de la société BASF (Mount Olive, NJ, USA). Le polymère a été solubilisé dans le milieu HAMF 12/Dulbecco's (DMEM) complété avec 10% de sérum de boeuf foetal (FBS, Atlanta Biologicals, Atlanta, GA) à une concentration finale de 17% (v/v) du gel Pluronic® F-127. La solution a été par la suite stérilisée par filtration (le filtre bottle top filter Nalgene, 0,22µm).

Pour la préparation du gel Pluronic® F-127, nous avons employé la technique au froid, selon Schmolka *et al* (1972). Une quantité de 17 g du gel Pluronic® F-127 a été lentement ajoutée dans un volume final de 90 ml du milieu MEM froid (5°C). La solution a été laissée sous agitation douce à 4°C, pendant 12 heures. Ceci permit la solubilisation rapide du gel et évite la formation des agrégats. Par la suite, la solution a été laissée à 4°C pendant la nuit pour que la solubilisation soit complète. A la fin, la solution a été stérilisée à l'aide d'un filtre (bottle top filter Nalgene, 0,22µm), puis complétée avec 10% (v/v) de FBS (FBS, Atlanta Biologicals, Atlanta, GA), pour une concentration finale de 17% (p/v). Les gels formés sont des gels thermo réversibles : liquides à une température comprise entre 0 et 15°C et solides à une température supérieure à 15°C.

## 2.2 CULTURE CELLULAIRE

Les cellules humaines dérivées de l'ostéosarcome (MG-63) ont été obtenues de l'American Type Culture Collection (Rockville, MD, U.S.A.). Les cellules au dix-huitième passage ont été mises en culture dans le milieu HAMF12/Dulbecco's (DMEM) contenant 10% FBS, 1% de pénicilline streptomycine (PS) (Gibco-BRL, Burlington, Ontario), et 50 µg/ml d'acide ascorbique, comme décrit précédemment (Hattar *et al.*, 2002).

Les cellules ont été cultivées dans un incubateur à 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité. À l'état de confluence, les cellules ont été décollées à l'aide d'un traitement à la trypsine (0,025% EDTA/0,01% trypsine, Invitrogen) pendant 5 minutes à 37°C. Les cellules ont été ensuite remises en culture à une dilution de 1/10.

Au jour « 0 » de l'expérience, les cellules ont été décollées, comptées et homogénéisées dans 17% du gel Pluronic® F-127 froid (10<sup>6</sup> cellules/ml) puis distribuées dans des plaques de 24 puits à raison de 2 ml par puits. Les cellules ont été maintenues en culture dans le gel pendant 2, 4 et 6 jours. Le temps 0 jours a été considéré comme contrôle. Nous n'avons pas ajouté de milieu sur le gel à cause de la réversibilité de ce dernier en son état liquide.

A chaque temps d'incubation, les cellules ont été comptées à l'aide d'un hématocytomètre puis utilisées pour plusieurs analyses telles que la

viabilité cellulaire, l'activité de la phosphatase alcaline, l'expression de la COX-2 et celle du collagène de type I.

### **2.3 DÉCOMPTE ET VIABILITÉ CELLULAIRE**

Afin d'évaluer la viabilité cellulaire des ostéoblastes MG-63 à chaque temps d'incubation, les cellules ont été récupérées à l'aide d'un ajout du milieu MEM au mélange cellules/gel Pluronic® F-127 puis l'ensemble a été placé au réfrigérateur à 4°C par 15 minutes afin de faciliter la liquéfaction du gel. Lorsque le gel retourne à sa forme liquide, le mélange cellules/gel Pluronic® F-127 a été récupéré et centrifugés.

Après 5 minutes de centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans du milieu MEM contenant 0.5g/ml de réactif MTT (Sigma, Aldrich, St-Louis - USA),ensemencé dans des plaques de 12 puits puis placé à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité pendant 3 heures. Par la suite, le MTT a été enlevé et un volume de 200 µl du mélange d'isopropanol plus HCLéthanol-DMSO a été ajouté. Enfin, ce liquide a été transféré dans une plaque de 96 puits pour faire la lecture à 570 nm.

## **2.4 MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA PHOSPHATASE ALCALINE (ALPase)**

L'activité de l'ALPase a été déterminée par la méthode basée sur la libération du p-nitrophénol hydrolysé à partir du phosphate de p-nitrophényle (12.5 mM) (Shi *et al*, 2002). Brièvement, les cellules ont été solubilisées dans un tampon d'ALPase (100 mM de glycine, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, et pH 10.5) sous agitation pendant 60 minutes à 4°C, puis soniquées pendant 5 secondes avant le dosage de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline. La concentration de protéines est dosée par la méthode de l'acide bicinchoninique (Smith *et al*, 1985). L'activité de l'ALPase est exprimée en nmol/mg protéine/30 minutes.

## **2.5 DOSAGE DE LA PROSTAGLANDIN E<sub>2</sub> PAR EIA (PGE<sub>2</sub>)**

La concentration du PGE<sub>2</sub> (Raisz *et al*, 1990) a été déterminée dans le milieu de culture en utilisant un kit commercial (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.) suivant les instructions du fabricant. Cette mesure est basée sur la compétition entre la PGE<sub>2</sub> endogène et un conjugué de PGE<sub>2</sub>-acetylcholinesterase pour une quantité fixe d'anticorps monoclonal anti PGE<sub>2</sub>. La sensibilité de cette analyse est de 9 pg/ml, et la gamme standard est comprise entre 10 et 1000 pg/ml. L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un

lecteur universel EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, U.S.A.).

## **2.6 L'EXPRESSION DU COLLAGÈNE DE TYPE I ET II ET DE LA COX-2**

### **2.6.1 L'expression des ARNm**

L'ARN total a été extrait à partir des ostéoblastes récupérés du gel Pluronic® F-127 tel que décrit précédemment (Mueller *et al*, 2001) en utilisant le réactif TRIzol (Invitrogen Life technologies) selon les instructions du fabricant. L'ARN total a été resuspendu dans l'eau stérile, dosé par spectrophotomètre, examiné par électrophorèse sur gel d'agarose et puis stockés à -80°C jusqu'à la réalisation de la RT-PCR (Lisignoli *et al*, 2001).

L'amplification des ARNm a été réalisée à l'aide d'un kit de RT-PCR (Invitrogen, Life Technologies, Burlington, Canada) permettant d'effectuer des étapes de transcription inverse et d'amplification de l'ADNc dans une seule étape. 1 µg d'ARN total est ajouté au milieu réactionnel contenant : 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 200 µM dNTP, 200nM d'oligonucléotide sense et antisense et 2 unités de chaque enzyme super script™ II reverse transcriptase DNA polymérase.

Les ARNm sont transcrit en ADNc durant une étape de 30 minutes à 42°C suivie d'une dénaturation à 95°C pendant 5 minutes. L'amplification de

l'ADNc se fait pendant 25 cycles composés de 45 secondes de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation des amorces à 60°C et 90 secondes d'élongation à 72°C, excepté le dernier cycle, pour lequel l'étape d'élongation a été prolongée à 10 minutes à 72°C.

Les oligonucléotides spécifiques utilisés dans cette étude sont :

- le collagène type I (461 bp) 5'- GGACACAATGGATTGCAAGG-3' (sense), 5'- TAACCACTGCTCCACTCTGG-3' (antisense) ;
- le collagène de type II (621 bp) 5' - AACTGGCAAGCAAGGAGACA-3'(sense), 5-AGTTTCAGGTCTCTGCA GG T-3' (antisense) ;
- la COX-2 (227 bp) 5' - TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3' (sense) 5'-AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3' (antisense) (Biosource international, Nivelles, Belgium) ;
- la GAPDH (600 bp) 5' - TCTAGACGGCAGGTCAQGGTCCAQCC-3' (sense) et 5' CCACCCATGGCAAATCCATGGCA-3'(antisense) (ADN, Montréal Canada).

Les produits de PCR ont été analysés et vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (P/V) contenant du tampon TBE (89 mM Tris, 2.5 mM EDTA, 8.9 mM borate). Des mesures semi-quantitatives de ces produits ont été faites en mesurant la densité optique (en unités arbitraires) de chaque bande à l'aide du système numérique de formation d'image (G-image 2000, Canberra Packard Canada, Mississauga, ON, Canada). Les résultats ont été présenté par de bandes spécifiques. La GAPDH a été utilisée comme contrôle

interne des ARNm. Les données ont été exprimées en pourcentage par rapport au contrôle.

### 2.6.2 L'expression protéique

Les cellules MG-63, une fois récupérées du gel F-127, ont été lavées deux fois avec le tampon PBS et suspendu dans le même tampon que celui utilisé dans la détermination de l'ALP. Après la détermination protéique, l'extrait cellulaire est ensuite diluée dans un tampon d'électrophorèse (8% SDS, 24% glycérol, 100 mM de Tris, à pH 6.8, 4% $\beta$  - mercaptoéthanol, et 0.02% de bleu bromophénol). Brièvement, 20  $\mu$ g de l'extrait cellulaire ont été séparés sur un gel discontinu de polyacrylamide (4-12%) en présence de 0.1% de SDS. Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) en utilisant un tampon de transfert contenant 25 mM de Tris, 192 mM de glycine et 20% méthanol. L'efficacité du transfert est contrôlée par une brève coloration de la membrane avec une solution de 5% d'acide acétique, contenant 0.1% (p/v) rouge Ponceau S (Sigma Chemical Co.) (Origuchi *et al.*, 2000).

Après le transfert, la membrane a été rincée plusieurs fois avec le tampon TTBS (Tris 20mM, pH7.4, NaCl 137 mM et 0.1% Tween 20), puis saturées durant la nuit à 4°C sous agitation dans du tampon TTBS contenant 5% (p/v) du lait écrémé. Par la suite, la membrane est incubée pendant 2h à



température ambiante sous agitation constante en présence des anticorps primaires dilués 1:1000 dans du TTBS additionné de 5% (p/v) du lait écrémé. Les anticorps utilisés sont : anticorps polyclonal de lapin anti-collagène de type I (Calbiochem, San Diego, CA), anticorps polyclonal de lapin anti-collagène type II (Calbiochem, San Diego, CA) et anticorps polyclonal de lapin anti-COX-2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan).

Les membranes sont alors lavées trois fois avec le TTBS et incubées pendant 1h à température ambiante sous agitation avec le deuxième anticorps (anti-lapin IgG - HRP, New England Biolabs).

Après plusieurs lavages avec le TTBS, la membrane est mise en contact avec un mélange équivolume de 2 solution commerciales de chemiluminescence intensifiée (LumiGLO Chemilumine Substrat cell Signaling technologic). La membrane a été ensuite préparée pour l'autoradiographie et exposée au film de Kodak X-Omat (Eastman kodak Ltd, Rochester, NY, USA) et puis analysée avec un système numérique de formation d'image (G-image 2000, Canberra Packard Canada, Mississauga, ON, Canada). Les résultats sont donnés en unités relatives et sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle non traité.

## 2.7 ANALYSES STATISTIQUES

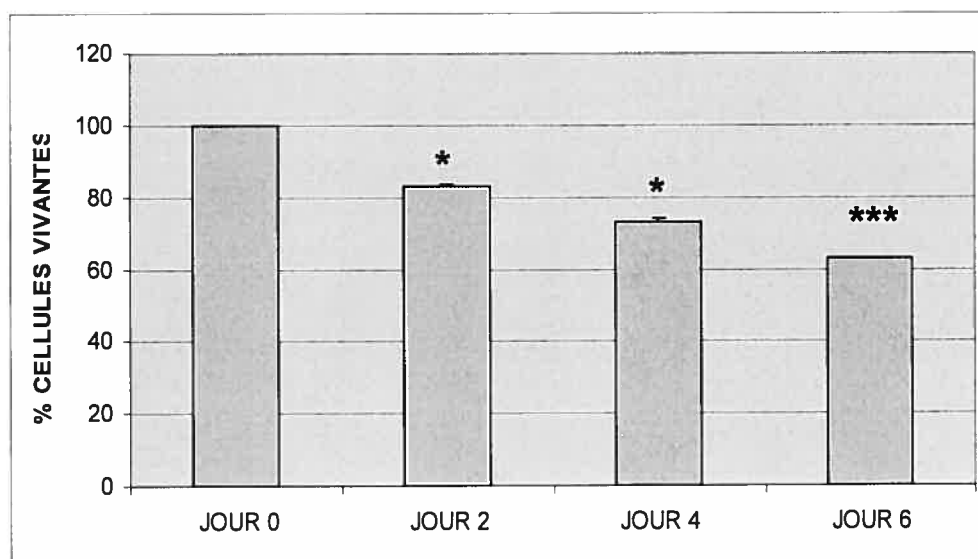
Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (erreur standard). La signification statistique des différences entre les valeurs moyennes est ensuite évaluée par le test *t* de Student's. Les résultats sont considérés statistiquement significatifs lorsque  $P < 0.05$ .

## **CHAPITRE 3 RÉSULTATS**

### **3.1 LA VIABILITÉ CELLULAIRE**

Pour la viabilité cellulaire, les résultats obtenus dans cette étude sont prometteurs, surtout au point de vue que les cellules ont été incubées dans une matrice composée de gel Pluronic® F-127 semi liquide. En plus, il était impossible d'immerger le gel dans le milieu de culture à cause de la réversibilité du gel vers la forme liquide.

Comparativement au contrôle (0 jour), nos résultats montrent que la viabilité cellulaire mesurée par le test MTT est évaluée respectivement à 83%, 73% et 63% après 2, 4 et 6 jours d'incubation (figure 3.1).



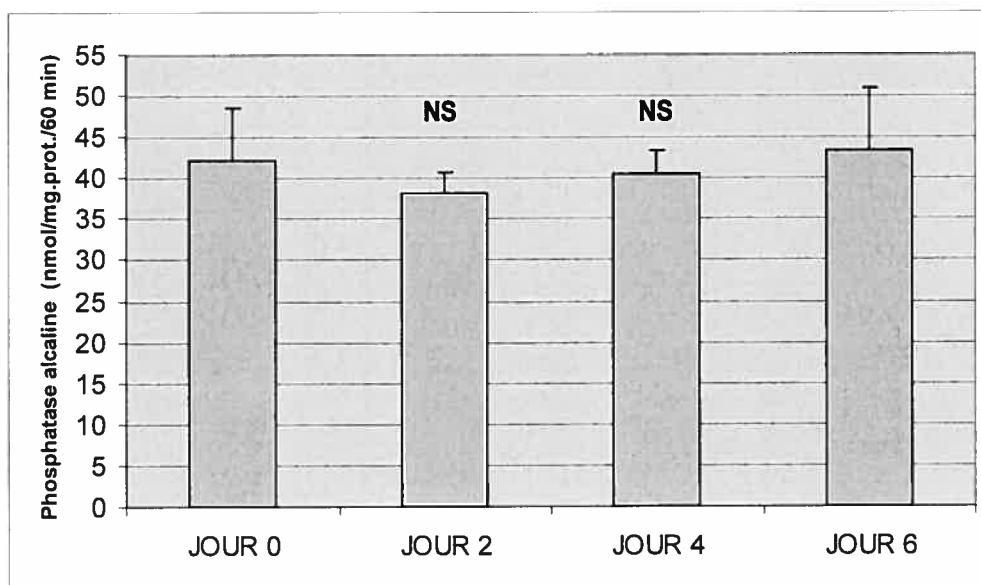
**Figure 3.1 La viabilité cellulaire des ostéoblastes MG-63 mesurée par le test MTT**

Les cellules MG-63 ont été incubées dans le gel Pluronic® F-127 pendant 0 (contrôle), 2, 4, 6 jours, récupérées, puis incubées pendant 3h dans le milieu MEM, contenant 0.5g/ml du réactif MTT. Les résultats de la viabilité cellulaire sont exprimés en % par rapport au contrôle (n = 3), \*P<0.05, \*\*\*P<0.001.

## **3.2 LE PHÉNOTYPE CELLULAIRE**

### **3.2.1 L'activité de la phosphatase alcaline**

Le phénotype des ostéoblastes MG-63 a été examiné par la mesure de l'activité de la phosphatase alcaline. L'expression typique du phénotype ostéoblastique des ces cellules n'est pas modifié lorsqu'elles sont incubées dans le gel Pluronic® F-127. Les résultats montrent une diminution non significative de l'activité de la phosphatase alcaline au second et au quatrième jours ; par la suite une légère augmentation de cette activité à partir du sixième jour. Ceci confirme que le phénotype cellulaire n'a pas subi de modification à cause du maintien des cellules MG-63 dans la matrice composée du gel Pluronic® F-127. (Figure 3.2)



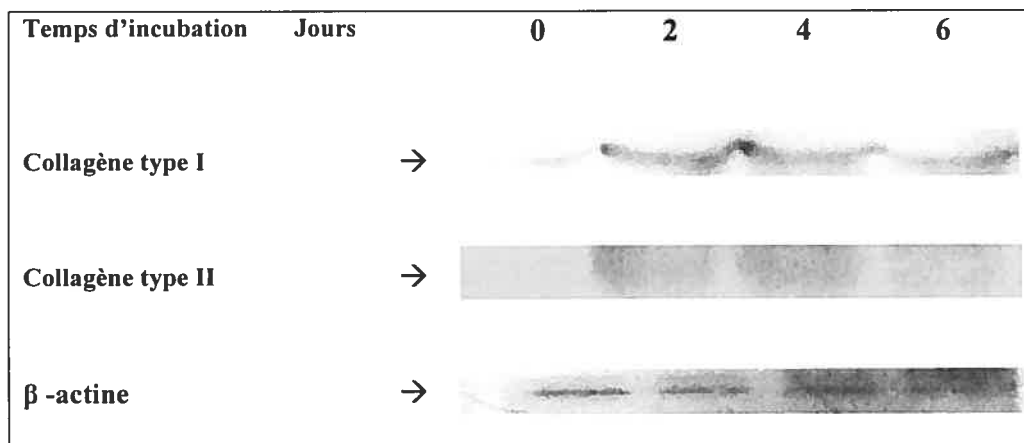
**Figure 3.2 Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline**

Les cellules MG-63 ont été incubées dans le gel Pluronic® F-127 pendant 0 (contrôle), 2, 4, 6 jours, récupérées, puis lysées dans du tampon ALPase. Le dosage de l'activité de la phosphatase alcaline est réalisé sur 75µl de l'extrait cellulaire et en présence de 12.5 mM de phosphate de p-nitrophényle et les résultats sont exprimés en nmol/mg prot/60 minutes (n = 3). NS – non significatif.

### 3.2.2 L'expression du collagène de type I

### **3.2.2.1 L'expression protéique**

Une importante caractéristique des ostéoblastes est la production du collagène de type I. L'expression du collagène de type I, a été évaluée par immunobuvardage, au temps zéro (contrôle), deuxième, quatrième et au sixième jours. Les résultats montrent une augmentation de la production du collagène de type I au deuxième, quatrième et sixième jours, mais pas celui de type II. (Figure 3.3).



**Figure 3.3 L'expression protéique du collagène de type I et de type II mesurée par Immunobuvardage**

20  $\mu$ g de l'extrait cellulaire des ostéoblastes MG-63 ont été séparées sur un gel discontinue 4 – 12% d'acrylamide puis soumis à une immunobuvardage en utilisant un anticorps anti-collagène type I et II, anticorps anti- $\beta$ -actine (contrôle positive) (n = 3).

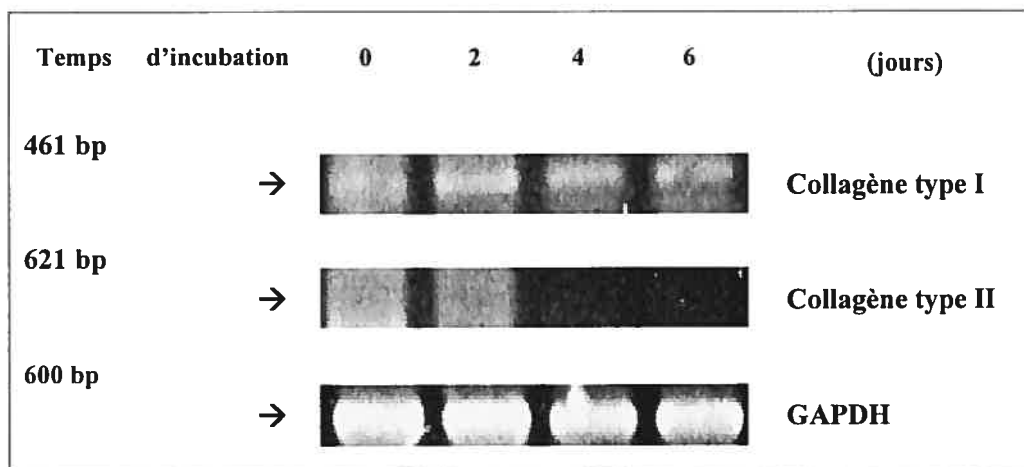


### 3.2.2.2 L'expression des ARNm

Par la suite nous avons voulu vérifier, par RT-PCR, si l'augmentation de l'expression protéique du collagène type I est associée à une augmentation de l'expression des ARNm.

Nos résultats démontrent que l'expression des ARNm du collagène de type I par les ostéoblastes MG-63 augmente à 2, 4, 6 jours d'incubation. Par ailleurs, nous constatons que l'expression des ARNm du collagène type II est complètement absente. Comparativement à la quantité totale de l'ARNm mesuré par la GAPDH, il semblerait qu'il y a une augmentation du niveau de l'ARNm du collagène type I.

Ces résultats suggèrent que l'interaction entre les cellules MG-63 et la matrice composée du gel Pluronic® F-127 semble avoir un effet positif sur l'expression du collagène de type I au niveau protéique et ARNm (figure 3.4).

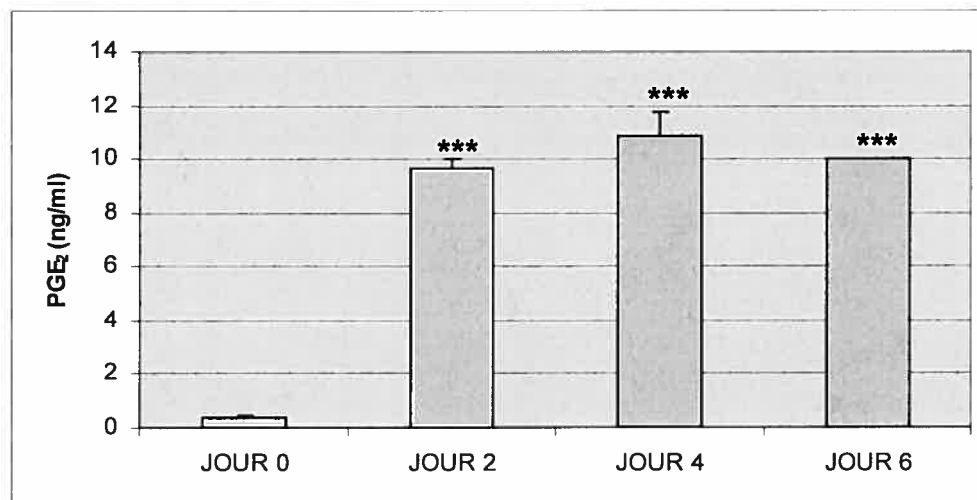


**Figure 3.4 L'expression des ARNm du collagène de type I et type II mesurée par RT-PCR**

Les ARNm totaux ont été extraits à partir des ostéoblastes MG-63 incubés à différents temps dans le gel Pluronic® F-127 puis analysés par RT-PCR tel que décrit dans la partie matériel et méthodes. La quantification du niveau des ARNm en unités arbitraires a été analysée par l'analyse densitométrique de chaque bande. Le niveau des ARNm est normalisé par la suite par rapport à celui des ARNm de la GAPDH. La GAPDH a été utilisée comme contrôle interne des ARNm. (n = 3).

### 3.3 DOSAGE DE LA PGE<sub>2</sub>

La production de PGE<sub>2</sub> a été évaluée dans la matrice contenant du gel et le milieu de culture. Les résultats montrent une augmentation de la production de PGE<sub>2</sub> après 2, 4, 6 jours d'incubation comparativement au jour 0. Au quatrième jour, il y a une augmentation plus importante que le jour 2. Au sixième jour, il y a une légère diminution de la production PGE<sub>2</sub>. (Figure 3.5)



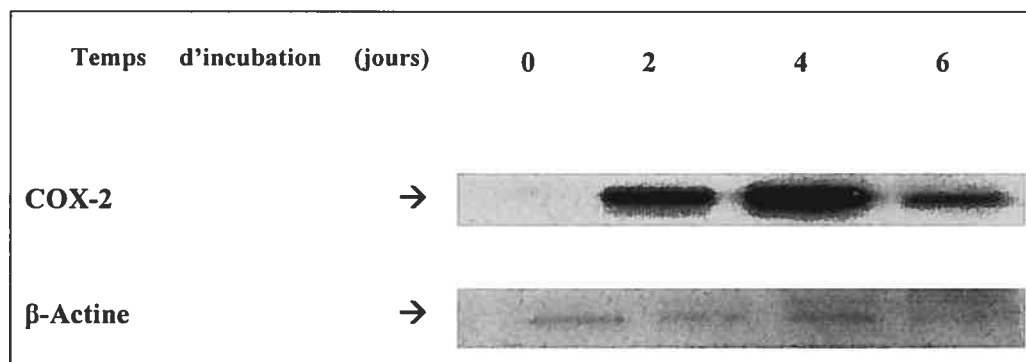
**Figure 3.5** Mesure de la production de la PGE<sub>2</sub> par EIA

Les ostéoblastes MG-63 ont été incubés à différents temps d'incubation dans le gel Pluronic® F-127. Le dosage de PGE<sub>2</sub> a été réalisé par EIA dans la matrice composée du gel et du milieu de culture. Les données sont exprimées en ng/ml protéine (n = 3), \*\*\* P<0.001.

### **3.4 L'EXPRESSION DE LA COX-2**

#### **3.4.1 L'expression protéique**

L'expression protéique de l'enzyme COX-2, qui est l'enzyme responsable de la production de la PGE<sub>2</sub>, est évaluée par immunobuvardage dans les ostéoblastes MG-63 incubés dans le gel Pluronic® F-127 à 0, 2, 4, 6 jours. Nos résultats montrent que l'expression protéique de la COX-2 suit la même tendance que la production de PGE<sub>2</sub>. Cette expression est plus importante au quatrième jour et diminue au sixième jour. (Figure 3.6)



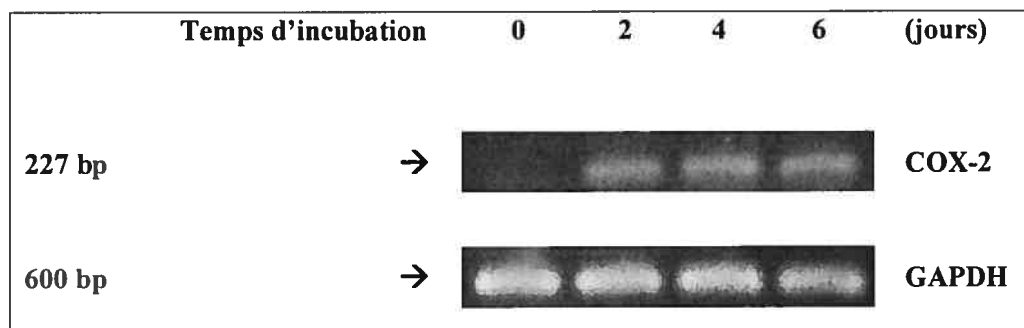
**Figure 3.6 L'expression protéique de la COX-2**

Les protéines de l'extrait cellulaire des ostéoblastes MG-63 ont été séparées sur un gel discontinue 4-12% d'acrylamide puis sous immunobuvardage en utilisant un anticorps anti-COX-2. La similitude révélée par des chargements à chaque jour a été vérifiée par le niveau d'actine révélé à l'aide d'un anticorps anti  $\beta$ -actine (contrôle positif) ( $n = 3$ ).

### 3.4.2 L'expression des ARNm

Afin de vérifier que l'augmentation de l'expression protéique de la COX-2 est associée à une augmentation des ARNm, nous avons extrait les ARN totaux des ostéoblastes MG-63 puis analysé les ARNm par RT-PCR. Les résultats montrent que l'expression des ARNm de la COX-2 suit le même profil que celui de l'expression protéique.

L'ensemble des résultats de la production de la PGE<sub>2</sub> et l'expression de la COX-2 (protéine et mRNA) suggère qu'une réaction inflammatoire pourrait être déclenchée lors de l'application *in vivo* du gel Pluronic® F-127.



**Figure 3.7 L'expression des ARNm de la COX-2 par RT-PCR**

Les ARNm totaux ont été extraits à partir des ostéoblastes MG-63 incubés à différents temps d'incubation dans le gel Pluronic® F-127 puis les ARNm ont été analysés par RT-PCR tel que décrit dans le matériel et méthodes. La quantification du niveau du ARNm a été réalisée telle quel décrite dans la légende 3.5 (n = 3).

## CHAPITRE 4 DISCUSSION

Cette étude a eu pour objectif d'examiner la viabilité des ostéoblastes MG-63 dans un gel thermosensible (Pluronic® F-127), ainsi que l'expression du phénotype des cellules osseuses dans une culture *in vitro*. Une solution de 17% en poids du gel Pluronic® F-127 a été choisie pour la culture cellulaire pour ses caractéristiques, une fois qu'il gélifie à la température corporelle (37°C) et il devient liquide à une température inférieure à 15°C.

Dans notre travail, la survie cellulaire évaluée à 83, 73, et 63% après 2, 4 et 6 jours d'incubation et le maintien de l'expression du phénotype ostéoblastique des cellules ont été comparables, sinon meilleures, à celles obtenus dans plusieurs études précédentes.

### 4.1 VIABILITÉ CELLULAIRE

Les résultats de cette étude ont démontré que la survie des cellules MG-63 dans un gel biodégradable et biocompatible, tel que le Pluronic® F-127, a comme conséquence une faible mortalité sans changement de leur phénotype. Cette mortalité n'est pas due à la cytotoxicité du polymère lui-même, mais très probablement à l'insuffisance de la diffusion de l'oxygène et la diffusion de nutriments dans le gel (Matthew *et al*, 2001). Etant donné les conditions expérimentales utilisées, la viabilité cellulaire doit tenir compte du fait que le



milieu de culture n'a pas été changé entre le premier jour et le sixième jour. Ceci ressemble à l'environnement présent au site d'une fracture dans les premières 24-72 h, où la nécrose tissulaire est présente et la revascularisation n'est pas encore efficace. Notre étude est la première à analyser les ostéoblastes MG-63 dans du polymère Pluronic® F-127 *in vitro*. La concentration minimale du gel Pluronic® F-127 pour qu'il puisse devenir solide est de 17%. En bas de cette concentration le gel restera toujours liquide et par conséquent il est impossible de l'utiliser comme matrice tridimensionnelle pour les ostéoblastes MG-63.

Une seule étude scientifique au sujet de l'utilisation d'une matrice osseuse associée au gel Pluronic® F-127 avec des ostéoblastes a été publiée jusqu'à présent (Ren *et al*, 2003). Les auteurs ont analysé les effets d'une culture tridimensionnelle *in vitro* dans un matériau bio-dérivé modifié ou non par le Pluronic® F-127 sur la croissance et la fonction des ostéoblastes du périoste de lapin. Dans le groupe avec le Pluronic® F-127, la croissance cellulaire, l'activité de la phosphatase alcaline et l'ostéogenèse ont été plus significative comparativement au groupe contrôle sans le gel.

Dans notre étude, nous avons observé une survie de 83, 73, et 63% après 2, 4 et 6 jours d'incubation comparativement au contrôle (jour 0). Dans une étude de culture des ostéoblastes de souris *in vitro* avec un gel en poly-éthylène glycol – dyacrylate (PEGDA) à 10%, Burdick *et al* (2002) ont observé une survie cellulaire de 62% après 24 h d'incubation. Les conditions de culture

dans notre étude et dans l'étude de Burdick *et al* étaient les mêmes (37° C, 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité).

La plus grande difficulté par rapport à la manipulation de ce gel est le choc thermique que les cellules souffrent quand elles entrent en contact avec le polymère liquide à une température autour de 12°C. Les cellules doivent être mélangées au polymère à l'état liquide, d'où la température approximative de 12°C. Matthew *et al* (2001) ont décrit la survie des hépatocytes HepG2 en culture dans un gel en Pluronic® F-127 à 17% (v/v) et ils ont observé qu'un facteur qui contribuerait également à la mort cellulaire serait le déficit d'oxygène et des nutriments dans la culture cellulaire dans le gel.

Il y a un certain nombre de mesures qui pourraient être prises dans un avenir immédiat afin d'améliorer la viabilité cellulaire et d'employer le gel Pluronic® F-127 à sa pleine capacité comme matériau biologique pour la réparation osseuse. Tout d'abord, la répétition du même procédé avec un autre type cellulaire montrerait probablement si la qualité du polymère (et des monomères résiduels possibles) affecte vraiment la croissance cellulaire. Par la suite, il serait possible de changer le milieu sur les gels de Pluronic® F-127 à tous les 2 jours, pour améliorer la diffusion nutritive aux cellules. De même, il serait possible d'ajouter des porteurs d'oxygène aux gels pour améliorer le transfert d'oxygène. En outre, la mesure des diverses propriétés métaboliques cellulaires autre que la viabilité simple serait par la suite des facteurs importants pour déterminer des applications cliniques potentielles.

Cai *et al* (2002), ont utilisé un film en poly(D,L-lactic acide) (PDLLA) avec le poly(acide aspartique) (PASP), à 2 poids moléculaires (~5 kDa et ~12 kDa), PASP-1 et PASP-2, pour analyser la viabilité cellulaire ostéoblastique de souris *in vitro*, pendant 7 jours. Les conditions de culture ont été les mêmes que celles de notre étude. Lorsque ils ont comparé le PDLLA modifié par le PASP-2 et par le PASP-1 avec le contrôle sans la modification, ils ont observé que la viabilité cellulaire a été plus significative avec le PASP-2 (130% par rapport au contrôle) et non significative dans le PASP-1.

Cai *et al* (2002) ont aussi étudié le PDLLA modifié par le chitosan en analysant la viabilité cellulaire des ostéoblastes de souris *in vitro*, pendant 7 jours. Les conditions de culture ont été aussi les mêmes que celles de notre étude. Lorsqu'ils ont comparé le contrôle (PDLLA sans chitosan) avec le PDLLA modifié par le chitosan, ils ont constaté que la viabilité cellulaire était exactement la même entre les deux.

Dans les deux études décrites ci-dessus, le milieu de culture a été changé à chaque 2 jours. Si appliquée dans notre étude, dont le milieu était le même pendant 6 jours, la viabilité cellulaire serait vraisemblablement plus élevée.

Nos résultats sont comparables avec plusieurs autres résultats déjà publiés (Burdick *et al*, 2002; Cai *et al*, 2002; Matthew *et al*, 2001). D'une façon générale, la majorité des polymères testés pour la réparation osseuse ont une

toxicité satisfaisante à court terme, lorsqu'ils sont utilisés avec des ostéoblastes ou bien avec autres types cellulaires. Au niveau du site de la fracture, dans les premières 24-72 h, l'environnement semble être pareil à notre matrice tridimensionnelle, en terme d'une baisse de la concentration de l'O<sub>2</sub> et en terme de l'intensité de la réponse inflammatoire.

Dans une future application clinique du gel Pluronic® F-127 avec des cellules ostéoblastiques comme une matrice tridimensionnelle, plusieurs conditions physiopathologiques de la fracture osseuse doivent être bien observées, telles que le processus inflammatoire initial et l'oxygénation locale. Dans le site d'une fracture osseuse, on peut observer après 24 à 72 h une libération de médiateurs vasoactifs, de facteurs de croissance et d'autres cytokines par les tissus blessés et les plaquettes. Ces facteurs influencent la migration, la prolifération, la différenciation cellulaire dans le site, et la synthèse de la matrice osseuse dans le site de la fracture.

Les facteurs de croissance recrutent des fibroblastes, des cellules mésenchymales et des cellules ostéoprogénitrices en direction du site de la fracture. Des macrophages, des polymorphonucléaires et des mastocytes arrivent au site fracturé pour commencer le processus du retrait des débris cellulaires (Buckley *et al*, 2004).

L'étape la plus importante dans une réparation d'une fracture osseuse est la phase inflammatoire et la formation de l'hématome. À partir de ce

moment, l'hématome est organisé et un mécanisme inflammatoire attire les cellules nécessaires pour lancer une réponse curative.

C'est dans la phase inflammatoire de la réparation osseuse qu'une matrice tridimensionnelle qui se trouverait dans le site serait très importante pour la prolifération cellulaire. Les cellules qui seraient dans le gel pour cette réparation iraient profiter de toute cette intense vascularisation locale pour se développer et, par la suite, former un nouveau tissu osseux. Khanal *et al* (2004) ont comparé, dans une étude avec des fractures diaphysaires tibiales fermées fraîches, le traitement conventionnel et le traitement avec l'injection de la moelle osseuse autologue sur le taux de consolidation. Le temps moyen de la consolidation osseuse a été de 3.65 mois pour l'injection et de 4.31 mois pour le traitement conventionnel. Ce résultat démontre que le potentiel ostéogénique est plus élevé lorsque les cellules sont présentes dans le site de la fracture osseuse avant le processus de consolidation.

L'oxygénation dans le site de la fracture osseuse est aussi fondamentale, car l'os sera formé par des cellules qui reçoivent assez d'oxygène et qui sont soumises à une stimulation mécanique appropriée. La dynamique de l'oxygénation dans la réparation osseuse a une importance pratique, car le taux de réparation de tissu change directement avec l'approvisionnement en oxygène. Les cibles principales de l'oxygène dans une fracture semblent être la synthèse du collagène et la différenciation des cellules-souche (Stanley *et al*, 1968).

Tuncay *et al* (1994) ont étudié les effets de l'hypoxie et de l'hyperoxie sur la fonction de l'ostéoblaste *in vitro*. Des cultures d'ostéoblastes de souris ont été exposées à l'O<sub>2</sub> à 90% et à 10%. La prolifération cellulaire, l'activité de la phosphatase alcaline et la synthèse du collagène ont été analysées. Les résultats de cette étude prouvent qu'en hypoxie (10% d'O<sub>2</sub>) la prolifération cellulaire augmente, tandis que l'activité de la phosphatase alcaline et la synthèse de collagène diminuent. En revanche, en hyperoxie la prolifération cellulaire est supprimée alors que l'activité de la phosphatase alcaline et de la synthèse de collagène augmentent. Dans les expériences où les cellules commencent à se développer en conditions hypoxiques et par la suite passent à des conditions hyperoxiques, leurs activités métaboliques sont abruptement renversées. Ces résultats, et ceux des rapports antérieurs, suggèrent un rôle très important de l'oxygène (un facteur environnemental) dans la réparation de l'os.

En conclusion, l'oxygénation dans le site d'une fracture osseuse joue un rôle très important dans le processus de réparation d'os. La faible quantité d'O<sub>2</sub> dans notre gel affecte peu la viabilité cellulaire des ostéoblastes. Ceci reflète aussi bien l'environnement au site de la fracture, où la pression partielle d'O<sub>2</sub> est faible.

En pratique, il serait intéressant de démontrer que la prolifération cellulaire des ostéoblastes dans la matrice tridimensionnelle du gel Pluronic® F-127, dans le site de la fracture, serait favorisée comparativement au processus *in vitro*, que nous avons décrit.

## 4.2 PHÉNOTYPE CELLULAIRE

### 4.2.1 Phosphatase Alcaline

Une stabilité relative de l'activité de la phosphatase alcaline a été observée au cours de différentes périodes d'incubation au sixième jour dans notre étude, malgré la diminution du nombre des cellules vivants.

L'activité de la phosphatase alcaline est le marqueur le plus fréquemment utilisé et reconnu comme représentatif du phénotype ostéoblastique. C'est une enzyme physiologiquement élaborée par les ostéoblastes lors de la minéralisation de la matrice osseuse. L'enzyme se nomme phosphatase alcaline parce qu'elle fonctionne dans des conditions alcalines, par opposition à la phosphatase acide, retrouvée dans la prostate (Boa Vida *et al*, 1997).

Dans l'analyse du phénotype cellulaire via la mesure de la phosphatase alcaline, on peut observer que l'expression typique du phénotype ostéoblastique des cellules MG-63 n'est pas modifiée lorsqu'elles sont incubées dans le gel Pluronic® F-127.

Selon une étude faite par Hishikawa *et al* (2004) un mélange de polymères thermoréversibles connus comme des TGP (polymère de gélification thermoréversible) [poly(*N*-isopropylacrylamide-co-*n*-butyl méthacrylate)] [poly(NIP-AAm-co-BMA)], polyéthylène glycol (PEG) et poly(NIPAAm-co-

BMA) associés à des cellules souche de la moelle osseuse humaine, confirme que l'activité de la phosphatase alcaline a été plus élevée avec ce polymère par rapport au contrôle sans gel. Yoshiaki *et al* (2000) ont cultivé des cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 *in vitro*, avec ou sans gel en poly(L-lactide) (PLLA) sur une plaque en verre, pendant 2 semaines. Dans la plaque revêtue par le gel en PLLA, l'activité de la phosphatase alcaline a été plus intense comparativement au contrôle. Ceci suggère que les cellules expriment leur phénotype ostéoblastique plus efficacement lorsque placées dans un environnement en trois dimensions. Une telle possibilité nous permettrait de suggérer un avantage potentiel d'un système de vectorisation de cellules basé sur un gel biocompatible.

Ishaug *et al* (1994) ont comparé un gel en PLLA au polystyrène (contrôle) *in vitro*, pendant 14 jours de culture. Les auteurs ont observé que l'activité de la phosphatase alcaline dans l'ostéoblaste de souris a été comparable dans les deux cas. Par contre, Goldstein *et al* (2001) ont étudié un gel en polymère poly(DL-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) avec des cellules ostéoblastiques de la moelle osseuse de souris en culture, à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> et 85% d'humidité, pendant 7 et 14 jours. Ils ont observé que l'activité de la phosphatase alcaline a diminué avec le temps de culture *in vitro*, malgré qu'il avait une augmentation de 13% du nombre de cellules. Dans notre étude, il y a une stabilité de l'activité de la phosphatase alcaline au jour 6, par rapport au



jour « 0 » (contrôle), malgré la diminution du nombre des cellules vivantes dans le gel.

Cai *et al* (2002) ont utilisé un film en poly(D,L-lactic acide) (PDLLA) avec le poly(acide aspartique) (PASP), à 2 poids moléculaires, PASP-1 (5000 Da) et PASP-2 (12,000 Da), pour tester l'activité de la phosphatase alcaline *in vitro* dans des cellules ostéoblastiques de souris pendant 7 jours. Les conditions de culture ont été les mêmes que celles de notre étude. Ils ont observé que la modification du PDLLA par le PASP-1 et PASP-2 augmente l'activité de la phosphatase alcaline comparativement au PDLLA non modifié.

Il est possible que la distribution spatiale tridimensionnelle des cellules dans des études avec des matrices polymériques facilite le métabolisme cellulaire. Dans notre étude, le niveau d'activité de la phosphatase alcaline est resté le même à 6 jours, malgré la baisse de 40% du nombre de cellules vivantes. Ceci indique que l'activité par cellule n'est pas modifiée à la baisse, donc que les cellules survivantes sont intactes et fonctionnelles. En outre, nos résultats se comparent favorablement à plusieurs études publiées [Cai *et al* (2002) ; Goldstein *et al* (2001) ; Ishaug *et al* (1994) ; Yoshiaki *et al* (2000)] avec différents polymères, car l'activité de la phosphatase alcaline n'est pas modifiée lorsque les ostéoblastes sont incubées dans le gel Pluronic® F-127.

#### 4.2.2 Collagène de type I

Lorsqu'un ostéoblaste est en activité, il produit et dépose du collagène de type I, le principal composant organique de la matrice osseuse. Dans notre étude, nous pouvons confirmer par immunobuvardage que cette production du collagène de type I par les ostéoblastes MG-63 augmente au deuxième, quatrième et sixième jours. Par contre, il n'y a pas de synthèse du collagène de type II. Par la suite, nous pouvons confirmer par RT-PCR que l'expression des ARNm du collagène de type I par les ostéoblastes MG-63 augmente aussi à 2, 4 et 6 jours d'incubation. En même temps, l'expression des ARNm du collagène de type II est complètement absente. Ces résultats démontrent qu'il y a une augmentation dans la production du collagène de type I du deuxième au sixième jour par rapport au jour « 0 ».

Tiejun *et al* (2001) ont réalisé une étude de culture *in vitro* des ostéoblastes (ostéosarcome humaine, HTB85) avec 3 modèles de verre bioactif : 1) BAG, 53% SiO<sub>2</sub>, 2) BCG, 58% SiO<sub>2</sub> et 3) le contrôle, pendant 4, 7 et 14 jours. Sur les BAG et BCG il y avait une couche de 60mm de polystyrène, la plaque contrôle n'ayant pas la couche. Les conditions expérimentales ont été les mêmes que celles utilisées dans notre étude. L'expression des ARNm du collagène de type I, dans les BAG et BCG a été très intense lorsque comparée au contrôle, aux jours 7 et 14.

Yang *et al* (2002) ont étudié la culture des ostéoblastes humains MG-63 avec une matrice tridimensionnelle de PLLA avec ou sans des antagonistes des canaux calciques (BAY K8644), pendant 1 et 3 semaines. Une tension mécanique d'une fréquence de 1Hz et de 1000 $\mu$ str, pendant 30 minutes a été appliquée dans l'échantillon avec des antagonistes de canaux calciques. Dans cette matrice tridimensionnelle, une expression plus significative du collagène type I a été observée, comparativement à la matrice tridimensionnelle contrôle (sans BAY K8644 et sans la tension mécanique).

Saad *et al* (2000) ont étudié la biofonctionnalité des ostéoblastes MC3T3-E1 de souris *in vitro*, cultivés dans une mousse de poly-ester-uréthane (Degra-Pol). La production du collagène de type I est augmentée, par contre diminue en présence de 1,25-dihydroxy de vitamine D (Vit. D). Une exposition des cellules à 100g de Vit.D/ml dans cette mousse, a réduit l'expression du collagène de type I de 50%.

Finalement, on se basant sur nos résultats et ceux de la littérature [Saad *et al* (2000); Tiejun *et al* (2001); Yang *et al* (2002)], nous constatons que le maintien des ostéoblastes dans différents polymères augmente l'expression du collagène de type I. Ces résultats pourraient indiquer que le contact cellules/matrice tridimensionnelle stimulerait la synthèse du collagène de type I comparativement aux cellules en monocouche.

### 4.3 COX-2

La COX-2 est une enzyme qui catalyse spécifiquement la production de certains messagers chimiques appelés les prostaglandines, dont la  $\text{PGE}_2$ . Certains de ces messagers sont responsables de l'apparition de l'inflammation. Cependant, l'inhibition de l'expression de la COX-2 réduit l'inflammation (Pierce *et al* 2001).

L'inflammation est un processus dynamique, constitué par un ensemble de réactions vasculaires, cellulaires, déclenchée par toute lésion tissulaire quel que soit la cause (infectieuse, physique, chimique ou ischémique). Elle permet l'élimination des agents agresseurs des débris cellulaires et la réparation des tissus lésés. La réparation peut aboutir à la restitution intégrale des structures tissulaires mais correspond le plus souvent à un processus de cicatrisation (Pierce *et al* 2001).

Lorsque un corps étranger pénètre dans l'organisme, une réaction inflammatoire est déclenchée pour lutter contre cette agression extérieure, et de ce point de vue elle est indispensable pour préserver le bon fonctionnement de l'organisme. Par contre, lorsque cette réaction prend trop d'ampleur, elle devient néfaste et peut perturber les différents processus physiologiques régissant le corps humain (Pierce *et al* 2001).

Dans le cas d'une greffe d'os, par exemple, suite à l'implantation du tissu dans le site anatomique, une réaction inflammatoire physiologique commence presque au même moment. C'est le début du processus de cicatrisation (Enneking *et al* 1991).

Dans notre étude, une réaction inflammatoire a été observée dans les jours 2, 4 et 6. Par contre, on peut observer que cette réaction commence à plafonner au sixième jour. Ceci suggère que le processus inflammatoire *in vitro* a une tendance à diminuer à partir du dernier jour d'incubation.

Nos résultats montrent que l'expression protéique de la COX-2 augmente au maximum au quatrième jour, puis diminue au sixième jour. L'expression des ARNm de la COX-2 suit le même profil que celui de l'expression protéique, ce qui confirme le phénomène inflammatoire réactionnel.

Amano *et al* (2002) suggèrent que la présence de la COX-2 dans le site de la réparation osseuse augmente l'angiogenèse locale, c'est qui pourrait favoriser une prolifération cellulaire plus intense et, par la suite, une formation osseuse normale.

Zhang *et al* (2002) ont démontré que la présence de l'enzyme COX-2 a un rôle très important dans la formation osseuse durant le processus de la réparation d'os. Cette étude *in vivo* a utilisé des souris normales et des souris génétiquement déficientes de l'enzyme COX-2. Chez les souris normales, l'induction de l'ostéogenèse a été très élevée comparativement aux souris

déficiences de la COX-2, (90% de la formation osseuse au 21<sup>ème</sup> jour versus 30%). Ces résultats ont démontré que la production de la COX-2 pendant la phase inflammatoire est fondamentale pour la réparation osseuse et que la différenciation des cellules mésenchymales est la cible principale de l'activité de la COX-2.

Huang *et al* (2003) ont étudié les effets de la résine en époxyde (AH26) et l'oxyde de zinc eugénol sur l'expression génique et protéique de la COX-2 dans les cellules ostéoblastiques humaines *in vitro* dans les dents endodontiquement traitées. Les conditions de culture ont été les mêmes que celles utilisées dans notre étude. Une forte expression de la COX-2 a été observée dans les premières heures, principalement à 4 h, mais à 24 h il y avait une diminution significative de cette expression. L'expression de la COX-2 pourrait induire une réaction inflammatoire au sommet de la racine dentaire, lors de l'implantation de ce biomatériau dans le canal dentaire.

McLean *et al* (2002) ont conclu qu'une expression sélective de la COX-2 pourrait être une interposition pharmacologique appropriée pour moduler la formation des capsules péri prothétique dans le site de la réparation osseuse.

Notre étude est la première étude qui démontre l'expression de la COX-2 par les ostéoblastes en contact avec le gel Pluronic® F-127. En outre, très peu d'articles ont été publiés au sujet de la COX-2 et des gels en polymères implantables avec des cellules ostéoblastiques (Huang *et al* 2003). On peut

observer une expression modérée de cette enzyme dans le début du processus, qui serait bénéfique pour la réparation osseuse.

#### 4.4 PGE<sub>2</sub>

Les PGEs sont des médiateurs qui ont une variété remarquable d'actions physiologiques dans la majorité des tissus des mammifères. La PGE<sub>2</sub> est une de ces PGs. C'est une substance hormonale qui participe à un éventail de fonctions de l'organisme, tels que la contraction et la relaxation du muscle lisse, la dilatation et la constriction des vaisseaux sanguins, le contrôle de la tension artérielle, et la modulation de l'inflammation. La PGE<sub>2</sub> est libérée par les parois des vaisseaux sanguins en réponse à l'infection ou à l'inflammation (Palomer *et al* 2002).

Dans notre étude, la production de PGE<sub>2</sub> a été évaluée dans le milieu de culture en utilisant un kit commercial (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.), et nos résultats montrent une augmentation de sa production aux jours 2, 4 et 6 comparativement au jour 0 (contrôle).

Lavigne *et al* (2004), qui ont utilisé des cellules ostéoblastiques MG-63 en culture avec des particules du gel en Polyméthylmétacrilate (PMMA) ont observé une production significative de PGE<sub>2</sub> par les ostéoblastes après 24 h

d'incubation. Dean *et al* (2001) ont utilisé des particules de polyéthylène (UHMWPE) dans la culture des ostéoblastes *in vitro*. Les auteurs ont suggéré que la production de PGE<sub>2</sub> a été stimulée par ces particules. Par contre, l'activité de la phosphatase alcaline a été diminuée drastiquement.

Horowitz *et al* (1995) ont comparé l'effet du Polyméthylmethacrylate (PMMA) et du titane sur la production de la PGE<sub>2</sub> par les ostéoblastes MC3T3 *in vitro*. Les conditions de culture ont été de 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité pour une période d'incubation de 24h, 48h, 72h et 96h. La production de PGE<sub>2</sub> a été plus importante dans le polymère comparée au titane.

Selon Lossdörfer *et al* (2004) la différenciation des ostéoblastes et l'activité de la phosphatase alcaline sont stimulés par la PGE<sub>2</sub> dans le début du processus inflammatoire. Raiz *et al* (1990) ont conclu que la production de la PGE<sub>2</sub> augmente la production du collagène de type I et contrôle sa synthèse. Dean *et al* (2001) ont observé qu'un bas niveau de PGE<sub>2</sub> est nécessaire pour la différenciation de l'ostéoblaste. Finalement, Qu *et al* (1999) ont constaté que la production de la PGE<sub>2</sub> dans les cellules parenchymateuses du foie augmente l'oxygénation cellulaire soit la respiration cellulaire.

La production de la PGE<sub>2</sub> observée dans nos cultures *in vitro*, à différents temps d'incubation, pourrait être positive pour l'expression du phénotype des ostéoblastes et pour l'expression du collagène de type I. Par contre, la difficulté d'oxygénation dans notre milieu de culture, inchangé du



début de l'expérience jusqu'au sixième jour, pourrait être responsable, en partie, pour la production de la PGE<sub>2</sub>.

Dans notre étude, l'ensemble des résultats de la production de la PGE<sub>2</sub> et l'expression de la COX-2 (protéine et mRNA) confirme qu'une réaction inflammatoire contre un corps étranger pourrait être déclenchée lors de l'application *in vivo* du gel Pluronic® F-127. Par contre, il n'y a pas de données dans la littérature qui décrit la production de la PGE<sub>2</sub>, lorsque les cellules ostéoblastiques MG-63 sont incubées *in vitro* dans le gel Pluronic® F-127 (Qu *et al* 1999). Comparativement aux autres études semblables à la notre, nous pourrions spéculer que la production de la PGE<sub>2</sub> augmente peu importe le type du polymère utilisé.

#### **4.5. APPLICATIONS CLINIQUES POTENTIELLES DE L'ÉTUDE**

Le tissu osseux possède l'avantage de pouvoir se régénérer. Mais cette régénération est lente. Le remodelage osseux, très progressif, obéit à une demande biologique et mécanique. Le mécanisme complexe de la reconstruction osseuse est le reflet d'une structure interne complexe, élaborée en fonction des contraintes biologiques et mécaniques ressenties par ce tissu composite. En effet, l'os est bien une matrice organique, dont la minéralisation confère une certaine rigidité.

L'idée de remplacer l'os par un matériau afin de rétablir une continuité osseuse n'est pas nouvelle. Les comportements biologiques et mécaniques des matériaux biologiques de reconstruction et de réparation osseuse guident les indications des différents produits. Un biomatériau qui puisse être utilisé dans l'os doit être résorbable et aussi entraîner la formation de l'os néoformé. Ce substitut doit être biologiquement inerte, facilement disponible, aisément adaptable en taille et en forme au site osseux à greffer.

L'utilisation de biomatériaux ne peut être justifiée que par la diminution des inconvénients liés à l'autogreffe tout en conservant un résultat final comparable ou meilleur. Le choix du biomatériau peut être guidé par sa résistance mécanique, sa biodégradabilité et son remplacement par un os néoformé.

Les formulations polymériques qui montrent la transition de fluide à gel aux conditions physiologiques sont de bons candidats pour des applications en génie tissulaire et en thérapie cellulaire. Les formulations injectables offrent plus d'avantages que les matrices préformés solides, tels que: la possibilité d'une implantation d'une façon minimalement invasive, d'une capacité de remplir la forme désirée, et d'incorporation facile de divers agents thérapeutiques. Plusieurs facteurs doivent être considérés avant qu'un gel injectable puisse être choisi en tant que candidat pour des applications de génie tissulaire. Indépendamment des interactions spécifiques aux cellules matrices du tissu, il est nécessaire de prendre en considération les propriétés du gel

suivantes : cinétique de la polymérisation, taux de résorption de la matrice, toxicité possible des produits de dégradation et de leurs itinéraires d'élimination, et l'interférence possible de la matrice de gel avec l'histogénèse.

Des nombreux biomatériaux sont à l'heure actuelle disponibles comme substituts du tissu osseux. Il sont utilisés soit en chirurgie orthopédique (comblements de lacunes osseuses, reprises de prothèses, ostéotomie et autres), en neurochirurgie (arthrodèses vertébrales), en chirurgie reconstructrice, ainsi que dans le domaine dentaire, en particulier dans le domaine de la parodontologie et de l'implantologie. À l'exception de l'autogreffe et de certains dérivés tels que la matrice osseuse déminéralisée ou des facteurs de croissance, dont la disponibilité est nécessairement limitée et qui pose des problèmes de prélèvement, aucun des biomatériaux disponibles aujourd'hui n'est ostéoinducteur. De plus, seules les allogreffes et les xélogreffes osseuses purifiées présentent une résistance mécanique suffisante pour pouvoir être mis dans des sites en charge. Ces matériaux sont ostéoinducteur et permettent une régénération osseuse guidée en grande partie par l'architecture du matériau, son état physicochimique de surface. Selon leur nature biochimique, ces matériaux sont d'ailleurs plus ou moins résorbables. Il apparaît clairement que présentement il existe une nécessité d'amélioration des matériaux osseux implantables de façon à augmenter l'adhérence des ostéoblastes à leur surface, à provoquer la différenciation *in situ* des précurseurs ostéoblastiques en

ostéoblastes actifs et à augmenter localement l'activité sécrétrice des ostéoblastes.

Il existe donc une demande pour la mise au point de biomatériaux de substitution synthétiques. Les gels en polymère peuvent représenter une solution prometteuse à ce problème.

## CHAPITRE 5 CONCLUSION

Le gel Pluronic® F-127 que nous avons utilisé dans cette recherche est un biomatériau très prometteur, permettant une viabilité cellulaire très significative et ne modifiant que peu le phénotype cellulaire à la suite de l'incubation des cellules MG-63 dans ce gel. La production de l'enzyme COX-2 et de la PGE<sub>2</sub> après plusieurs jours d'incubation peut suggérer qu'une réponse inflammatoire physiologique dans le début d'une réparation osseuse serait bénéfique pour ce processus de réparation. Il serait le moment idéal pour placer le gel avec des cellules dans le site à réparer. Tous ces résultats pourraient signifier que le métabolisme cellulaire s'exprimerait plus efficacement lorsque les cellules sont placées dans un environnement tridimensionnelle. Ceci serait un avantage potentiel d'un système vectoriel de cellules basé sur un gel biocompatible. Nous pouvons conclure que dans notre travail inédit, en appliquant des ostéoblastes dans un milieu de culture *in vitro*, nos résultats sont très prometteurs pour des applications cliniques futures en thérapie cellulaire et en génie tissulaire. Cette étude est un important premier pas pour le développement d'un biomatériau pour la réparation osseuse. Nous allons continuer notre recherche avec des études *in vivo* pour confirmer nos résultats dans un modèle de fracture chez le lapin.

## Références

Alexandridis P. (1997) Poly(ethylene oxide)poly(propylene oxide) Block Copolymer Surfactants. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2:478.

Amano H., Haysahi I., Yoshida S., Yoshimura H. & Majima M. (2002) Cyclooxygenase-2 and Adenylate Cyclase/protein Kinase A Signaling Pathway Enhances Angiogenesis Through Induction of Vascular Endothelial Growth Factor in Rat Sponge Implants. *Hum Cell.* 15(1):13-24.

Arévalo-Silva C., Eavey RD., Cao Y., Vacanti M., Weng Y. & Vacanti CA. (2000) Internal Support of Tissue-engineered Cartilage. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 126:1448-1452.

Boa Vida M.J., Hamza W., Ruggiu D. & Marques R.T. (1997) Eutrophication: Alkaline Phosphatase Revisited. *Mem Ist Ital Idrobiol.* 56:15-21.

Brown W., Schillen K., Almgren M., Hvidt S & Bahadur (1991) Micelle and gel Foramation in a Poly(ethylene oxide)/poly(propylene oxide)/poly(ethylene oxide) Triblock Copolymer in Water Solution: Dynamic and Static Light Scattering and Oscillatory Shear Measurements. *J Phys Chem.* 95(4):1850-1858.

Buckley R. & Arneja S. (2004) General Principles of Fracture Care. *Canadian Orthopedic Association.* 1-22.

Burdick JA & Kristi AS. (2002) Photoencapsulation of Osteoblasts in Injectable RGD-modified PEG Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*. 23:4315-4323.

Cai K., Yao K., Hou X., Wang Y., Hou Y., Yang Z., Li X. & Xie H. (2002) Improvement of the Functions of Osteoblasts Seeded on Modified Poly(D,L-lactic acid) with Poly (aspartic acid). *J Biomed Mater Res*. 62:283-291.

Cai K., Yao K., Cui Y., Lin S., Yang Z., Li X., Qing T. & Luo J. (2002) Surface Modification of Poly(D,L-lactic acid) with Chitosan and its Effects on the Culture of Osteoblasts *in vitro*. *J Biomed Mater Res*. 60(3):398-404.

Cao YL., Rodriguez A., Vacanti M., Ibarra C., Arevalo C. & Vacanti CA. (1998) Comparative Study of the Use of Polyglycolic Acid, Calcium Alginate and Pluronics in the Engineering of Autologous Porcine Cartilage. *J Biomater Sci Polymer Ed*. 5:475-487.

Cao Y.L., Ibarra C. & Vacanti C. (1999) Preparation and Use of Thermosensitive Polymers. In: *Tissue Engineering: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Presse.

Chen-Chow P.C. & Frank S.G. (1981) In Vitro Release of Lidocaine from Pluronic F-127 Gels. *Int J Pharm*. 8:89-99.

Chi S.C. & Jun H.W. (1990) Anti-inflammatory Activity of Ketoprofen Gel on Carageenan-induced Paw Edema in Rats. *J Pharm Sci*. 79:974-977.

Cima L.G., Vacanti J.P., Vacanti C., Ingber D., Mooney D. & Langer R. (1991) Tissue Engineering by Cell Transplantation Using Degradable Polymer Substrates. *J. Biomech Eng*. 113:143-151.

Collett J.H., Tait C.J., Attwood D., Sharma H.L. & Smith A.M. (1985) In Vivo Evaluation of Poloxamer Gels as Controlled Release Systems Using Gamma Scintigraphy. *Proc Int Symp Control Rel Bioact Mater.* 12:28-29.

Dean D.D., Lohmann C.H., Sylvia V.L., Köster G., Liu Y., Schwartz Z. & Boyan B.D. (2001) Effect of Polymer Molecular Weight and Addition of Calcium Stearate on Response of MG-63 Osteoblast-like Cells to UHMWPE Particulates. *Journal of Orthopaedic Research.* 19:179-186.

Enneking W.F., Mindell E.R. (1991) Observations on Massive Retrieved Human Allografts. *Joint Surg.* 73A:1123-1142.

Gilbert J.C., Hadgraft J., Bye A. & Brookes L.G. (1986) Drug Release from Pluronic F-127 Gels. *Int J Pharm.* 32:223-228.

Gilbert J.C., Washington C., Davies M.C. & Hadgraft J. (1987) The Behavior of Pluronic F-127 in Aqueous Solution Studied Using Fluorescent Probes. *Int J Pharm.* 40:93-99.

Goldstein A.S., Juarez T.M., Helmke C.D., Gustin M.C. & Mikos A.G. (2001) Effect of Convection on Osteoblasts Cell Growth and Function in Biodegradable Polymer Scaffold. *Biomaterials.* 22:1279-1288.

Gusman M., Garcia F.F., Molpercres J. & Aberturas M.R. (1992) Polyoxyethylene-polyoxypropylene Block Copolymer Gels as Sustained Release Vehicles for Subcutaneous Drug Administration. *Int J Pharm.* 80:119-127.



Gutowska A., Jeong B. & Jasionowski M. (2001) Injectable Gels for Tissue Engineering. *The Anatomical Record*. 263:342-349.

Hattar S., Berdal A., Asselin A., Loty S. Greenspan D.C. & Sautier J-M. (2002) Behaviour of Moderately Differentiated Osteoblast-Like Cells Cultured in Contact with Bioactive Glasses. *European Cells and Materials*. Vol.4:61-69.

Henry R.L. & Schmolka I.R. (1989) Burn Wound Coverings and the Use of Poloxamer Preparations. *Crit Rev Biocompat*. 5:207-220.

Hishikawa K., Miura S., Marumo T., Yoshioka H., Miura M., Marumo T., Yoshioka H., Mori Y., Takato T. & Fujita T. (2004) Gene Expression Profile of Human Mesenchymal Stem Cells During Osteogenesis in Three-Dimensional Thermosensible Gelation Polymer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 317:1103-1107.

Horowitz S.M. & Gonzales J.B. (1996) Inflammatory Response to Implant Particulates in a Macrophage/Osteoblast Coculture Model. *Calc Tissue Int*. 59:392-396.

Huang F.M., Chou M.Y. & Chang Y.C. (2003) Induction of Cyclooxygenase-2 mRNA and Protein Expression. *Biomaterials*. 24:1869-1875.

Ishaug S.L., Yaszemski M.J., Bizios R. & Mikos A.G. (1994) Osteoblasts Function on Synthetic Biodegradable Polymers. *J Biomed Mater Res*. 28:1445-53.

Jeong B., Bae Y.H., Lee D.S. & Kim S.W. (1997) Biodegradable Drug Delivery Systems as Injectable Drug Delivery Systems. *Nature*. 388:860-862.

Jeong B., Bae Y.H. & Kim S.W. (1999) Thermoreversible Gelation of PEG-PLGA-PEG Triblock Copolymer Aqueous Solutions. *Macromolecules*. 32:7064-7069.

Jeong B., Bae Y.H. & Kim S.W. (2000a) In Situ Gelation of PEG-PLGA-PEG Triblock Copolymer Aqueous Solution and Degradation Thereof. *J Biomed Mater*. 50:171-177.

Jeong B., Bae Y.H. & Kim S.W. (2000b) Drug Release from Biodegradable Injectable Thermosensible Hydrogel of PEG-PLGA-PEG Triblock Copolymer. *J Control Release*. 63:155-163.

Khanal G.P., Garg M. & Singh G.K. (2004) A Prospective Randomized Trial of Percutaneous Marrow Injection in a Series of Closed Fresh Tibial Fractures. *International Orthopaedics (SICOT)*. 28:167-170.

Landis W.J., Hodgins K.J., Arena J., Song M.J. & McEwen B.F. (1996) Structural Relation Between Collagen and Mineral in Bone as Determined by High Voltage Electron Microscopic Tomography. *Microscopy Research and Technique*. 33:192-202.

Lavigne P., Shi Q., Lajaunesse D., Dehnade F. & Fernandes J.C. (2004) Metabolic Activity of Osteoblasts Retrieved from Osteoarthritic Patients After Stimulation with Mediators Involved in Periprosthetic Loosening. *Bone*. 34:478-486.

Lee J.Y, Nam S.H., Im S.Y., Park Y.J., Lee Y.M., Seol Y.J., Chung C.P. & Lee S.J. (2002) Enhanced Bone Formation by Controlled Growth Factor Delivery from Chitosan-Based Biomaterials. *Journal of Controlled Release*. 78:187-197.

Linse P. & Hatton T.A. (1997). Mean-Field Lattice Calculations of Ethylene Oxide and Propylene Oxide Containing Homopolymers and Triblock Copolymers at the Air/Water Interface. *Langmuir*. 13:4066-4078.

Lisignoli G., Zini N., Remiddi G., Piacentini A., Puggioli A., Trimarchi C., Fini M., Maraldi N.M. & Facchini A. (2001) Basic Fibroblast Growth Factor Enhances *in vitro* Mineralization of Rat Bone Marrow Stromal Cells Grown on Non-woven Hyaluronic Acid Based Polymer Scaffold. *Biomaterials*. 22:2095-2105.

Lossdörfer S., Schwartz Z., Lohmann C.H., Greenspan D.C., Ranly D.M. & Boyan B.D. (2004) Osteoblast Response to Bioactive Glasses *in vitro* Correlates with Inorganic Phosphate Content. *Biomaterials*. 25:2547-2555.

Malmsten M. & Lindman B. (1992) Self-assembly in Aqueous Block Copolymer Solution. *Macromolecules*. 25:5446-5450.

Matthew J. (2001) Polymeric Gels as Cell Encapsulation Materials for Tissue Engineering. *Hamilton Sundstrand Summer I Internship Program (HSSIP)*. University of Massachusetts.

McLean A.L., Talmor M., Harper A., Fahey T.J., Gayle L.B. & Hoffman L.A. (2002) Expression of Cyclooxygenase-2 in the Periprosthetic Capsule Surrounding a Silicone Shell Implant in the Rat. *Ann Plast Surg*. 48(3):292-7.

Miller S.C. & Donovan M.D. (1982) Effect of Poloxamer 407 Gel on the Mitotic Activity of Pilocarpine Nitrate in Rabbits. *Int J Pharm*. 12:147-152.

Miyazaki S., Takeuchi S., Yokouchi C. & Takada M. (1984) Pluronic F-127 Gels as a Vehicle for Topical Administration of Anticancer Agents. *Chem Pharm Bull.* 32:4205-4208.

Miyazaki S., Nakamura T., Yokouchi C. & Takada M. (1987) Effect of Pluronic Gels on the Rectal Absorption of Indomethacin in Rabbits. *Chem Pharm Bull.* 35:1243-1248.

Miyazaki S., Tobiyama T., Takada M. & Attwood D. (1995) Percutaneous Absorption of Indomethacin from Pluronic F-127 Gels in Rats. *J Pharm Pharmacol.* 47:455-457.

Moghimi S.M. & Hunter A.C. (2000) Poloxamer and Poloxamines in Nanoparticle Engineering and Experimental Medicine. *Tibtech.* Vol. 8.

Muellet S.M. & Glowacki J. (2001) Age-related Decline in the Osteogenic Potential of Human Bone Marrow Cells Cultured in Three-dimensional Collagen Sponges. *J. Cell Biochem.* 82(4):583-90.

Nace V.M. *et al.* (1996) Nanionic Surfactants. *Marcel-Dekker* :NY.

Nalbandian R.M. *et al.* (1987) Pluronic F-127 Gel Preparation as an Artificial Skin in the Treatment of Third-degree Burns in Pigs. *J Biomed Mater Res.* 21:1135-1148.

Origuche T., Migita K., Nakashima T., Honda S., Yamasaki S., Hida A., Kawakami A., Aoyagi T., Kawabe Y., Eguchi K. (2000). Regulation of

Cyclooxygenase-2 Human Osteoblastic Cells by N-acetylcysteine. *J. Lab Clin Med.* Nov;136(5):390-4.

Palomer A, Cabré F., Pascual J., Campos J., Trujillo M.A., Entrena A., Gallo M.A., Garcia L., Mauléon D. & Espinosa A. (2002) Identification of Novel Cyclooxygenase-2 Selective Inhibitors Using Pharmacophore Models. *J Med Chem.* 45:1402-1411.

Pandit N.K. & Kisaka J. (1996) Loss of Gelation Ability of Pluronic® F 127 in the Presence of Some Salts. *International Journal of Pharmaceutics.* 145:129-136.

Paredes Y., Massicote F., Pelletier J.P., Martel-Pelletier J., Laufer S. & Lajeunesse D. (2002) Study of the Role of Leukotriene B(4) in Abnormal Function of Human Subchondral Osteoarthritis Osteoblasts: Effects of Cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase Inhibition. *Arthritis Rheum.* 46(7):1804-12.

Payne R.G., McGonigle J.S., Yaszemski M.J., Yasko A.W. & Mikos A. (2002) Development of an Injectable, in situ Crosslinkable, Degradable Polymeric Carrier for Osteogenic Cell Population. Part 2. Viability of Encapsulated Marrow Stromal Osteoblasts Cultured on Crosslinking Poly(propylene fumarate). *Biomaterials.* 23:4373-4380.

Pec E.A., Wout Z.G. & Johnston T.P. (1992) Biological Activity of Urease Formulated in Ploxamer 407 After Intraperitoneal Injection in the Rat. *J Pharm Sci.* 81:626-630.

Pierce G.F., Tarpley J.E., Allman R.M., Goode P.S., Serdar C.M., Morris B., Vendeber G.J., & Mustoe T.A. (1994) Tissue Repair Processes in Healing Chronic Pressure Ulcers Treated with Recombination Growth Factor BB. *AM J Pathol.* 145:1399-1410.

Pierce G.F. (2001) Inflammation in Nonhealing Diabetic Wounds: the Space-time Continuum does Matter. *Am J Pathol.* 159(2):399-403.

Qu W., Graves L.M. & Thurman R.G. (1999) PGE<sub>2</sub> Stimulates O<sub>2</sub> Uptake in Hepatic Parenchymal Cells: Involvement of the cAMP-dependent Protein Kinase. *Am J Physiol.* 277:G1048-G1054.

Raisz L.G. & Fall P.M. (1990) Biphasic Effects of Prostaglandin E<sub>2</sub> on Bone Formation in Cultured Fetal Rat Calvariae: Interaction with Cortisol. *Endocrinology.* 126:1654-9.

Rassing J. & Attwood D. (1983). Ultrasonic Velocity and Light-Scattering Studies on the Polyoxyethylene-polyoxypropylene Copolymer Pluronic F-127 in Aqueous Solution. *Int J Pharm.* 13:47-55.

Ren Y.X., Yang Z.M. & Li X.Q. (2003) Experimental Study of Modified Bio-derived Material by Pluronic F-127. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 17(1):52-5.

Saad B., Casotti M., Huber T., Schmutz P., Welti M., Uhlschmid G.K., Neuenschwander P. & Suter U.W. (2000) In Vitro Evaluation of the Biofunctionality of Osteoblasts Cultured on DegraPol-foam. *J Biomater Sci Polym.* 11(8):787-800.

Saim A.B., Cao Y., Weng Y., Chang C.N., Vacanti M.A., Vacanti C.A. & Eavey R.D. (2000) Engineering Autogenous Cartilage in the Shape of a Helix Using an Injectable Hydrogel Scaffold. *The Laryngoscope.* 110:1694-1697.

Schmolka I.R. (1972) Artificial Skin I. Preparation and Properties of Pluronic F-127 Gels for Treatment of Burns. *J Biomed Mater Res.* 6:571-582.

Shi Q., Lajeunesse D., Reboul P., *et al.* (2002) Metabolic Activity of Osteoblasts from Periprosthetic Trabecular Bone in Failed Total Hip Arthroplasties and Osteoarthritis as Markers of Osteolysis and Loosening. *J. Rheumatol.* 29:1437-45.

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T. *et al.* (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem.* 150:76-85.

Spangenberg K.M., Farr M.M., Roy A.K., Bonassar L.J., Vacanti C.A. & Cortiella J. (1998) Tissue Engineering of Tracheal Epithelium: a Model of Isolation and Culture in Pluronic F-127 NF, *Tissue Eng.* 4(4), 476.

Stanley V., Hunt J., Willis K.W. & Stephen C.R. (1968) Cardiovascular and Respiratory Function with CI-581. *Anesth Analg.* 47(6):760-8.

Steinleitner A., Lambert H., Kazenski C. & Cantor B. (1991) Poloxamer 407 as an Intraperitoneal Barrier Material for the Prevention of Postsurgical Adhesion Formation and Reformation in Rodent Models for Reproductive Surgery. *Am J Obst Gynecol.* Vol 77; n.1.

Suh H. & Jun H.W. (1996) Physicochemical and Release Studies of Naproxen in Poloxamer Gels. *Int J Pharm.* 129:13-20.

Sun Y.Q., Lu S.B. & Wang J.F. (1992) In Vitro and In Vivo Effects of PGE<sub>2</sub> on Cements fixation of Implant. *Chin Med J.* 105(9):742-8.

Tan J.S. *et al.* (1993) Surface Modification of Nanoparticles by PEO/PPO Block Copolymers to Minimize Interaction with Blood Components and Prolong Blood Circulation in Rats. *Biomaterials*. 14:823.

Thomsom R.C., Yaszemski M.J., Powers J.M., *et al.* (1995) Fabrication of Biodegradable Polymer Scaffolds to Engineer Trabecular Bone. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 7,23-28.

Tiejun G., Hannu T.A., Heimo Y.N. & Eero V. (2001) Silica-based Bioactive Glasses Modulate Expression of Bone Morphogenetic Protein-2 mRNA Saos-2 Osteoblasts In Vitro. *Biomaterials*. 22:1475-1483.

Tomida H., Shinohara M., Kuwaka N. & Kiryu S. (1987) In Vitro Release Characteristics of Diclofenac and Hydrocortisone from Pluronic F-127 Gels. *Acta Pharm Suec.* 24:263-272.

Tuncay O.C., Ho D. & Barker M.K. (1994) Oxygen Tension Regulates Osteoblast Function. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 105(5):457-63.

Vacanti C.A, Langer R., Schloo B., & Vacanti J.P. (1991). Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Recon Surg.* 88:753-758.

Vacanti J.P., Morse M.A., Saltzman W.M., Domb A.J., Perez-Atayde A. & Langer R. (1988) Selective Cell Transplantation Using Bioabsorbable Artificial Polymers as Matrices. *J Pediat Surg.* Vol.23, pp.3-9.



Verderio E., Coombes A., Jones A.R., Li X., Heath D., Downes S. & Griffin M. (2000) Role of the Cross-linking Enzyme Tissue Transglutaminase in the Biological Recognition of Synthetic Biodegradable Polymers. *John Wiley & Sons, Inc.* 294-304.

Walker H.L. & Mason A.D. Jr. (1968) A Standard Animal Burn. *J Trauma.* 8:1049-1051.

Wanka G., Hoffmann H. & Ulbricht W. (1990) The Aggregation Behavior of Poly(oxyethylene)-poly(oxyethylene)-Blockcopolymers in Aqueous Solutions. *Colloid Polym Sci.* 268:101-117.

Yang Y., Magnay J.L., Cooling L. & El Haj A.J. (2002). Development of a "Mechano-active" Scaffold for Tissue Engineering. *Biomaterials.* 23:2119-2126.

Yoshiaki I., Tsuchiya T. & Nakamura A. (2000) Effect of Heat Treatment of Poly(L-lactide) on the Response of Osteoblast – Like MC3T3-E1 Cells. *Biomaterials.* 21:1259-1267.

Zhang X., Schwarz E.M., Young D.A., Puzas E., Rosier R.N. & O'Keefe R.J. (2002) Cyclooxygenase-2 Regulates Mesenchymal Cell Differentiation Into the Osteoblast Lineage and is Critically Involved in Bone Repair. *The Journal of Clinical Investigation.* Volume 109, Number 11.

Zinner D.D., Duany L.F. & Lutz H.J. (1997) A New Desensitizing Dentrifice: Preliminary Report. *J Am Dent Assoc.* 95:982-990.